Zur Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung und Mutabilität von Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Klaus Haefner

aus Berlin

1965

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Zur Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung und Mutabilität von Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Klaus Haefner

aus Berlin

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1. Referent: Senator Prof. Dr. W. Stein
2. Referent: Magnifizenz Prof. Dr. H. Lüers

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1965

Tag der Promotion: 19. März 1965

Inhalt

1. Die Deutung der strahleninduzierten Inaktivierung bei Saccharomyces unter besonderer Berücksichtigung genetischer Veränderungen 1

1.1. Inaktivierung durch Röntgenstrahlen 3

1.2. Inaktivierung durch ultraviolettes Licht . . . 7

1.3. Diskussion der Voraussetzungen und ungeklärten Fragen, die sich aus der Aufstellung eines mathematischen Modells für die Inaktivierung von Saccharomyces ergeben. Problemstellung . . . 9

2. Methode 17

2.1. Stämme 17

2.2. Nährmedien 20

2.3. Durchführung und Auswertung der Mutationsexperimente 22

2.3.1. Zur Problematik des "Rückmutations"-Testes . . 22

2.3.2. Bestimmung der spontanen Mutationsraten . . . 23

2.3.3. Bestimmung der strahleninduzierten "Rückmutationsraten". 26

2.3.3.1. Rechnerischer Ansatz 27

2.3.3.2. Überprüfung der Voraussetzungen 29

2.3.3.3. Durchführung der Nachbehandlungsexperimente . 32

2.3.4. Bestimmung der Mutationsraten für rezessiv letal wirkende Genzustände 33

2.3.4.1. Rechnerischer Ansatz 33

2.3.4.2. Durchführung der Experimente 36

2.4. Untersuchung des "mitotischen crossover" . . . 37

2.5. Aufnahme der Teilungsstammbäume (TSB). 38

2.5.1. Teilungsstammbäume nach UV-Bestrahlung 39

2.5.2. Teilungsstammbäume nach Röntgenbestrahlung . . 39

2.6. Durchführung aller Tetradenanalysen 40

2.7. Durchführung der Bestrahlungen 41

2.8. Bestimmung der wirksamen Strahlendosis 41

2.8.1. Wirksame UV-Dosis 42

2.8.2. Wirksame Röntgendosis 47
2.9. Methoden zur Fehlerabschätzung 48
2.9.1. Fehlerabschätzung für die spontanen Mutationsraten 48
2.9.2. Fehlerabschätzung für die strahleninduzierten Mutationsraten 49

3. Ergebnisse und Diskussion der Teilergebnisse . 51
3.1. Zur Ploidiegradabhängigkeit von Mutationsraten 51
3.1.1. Die spontane Mutabilität fast isogener und homozygoter Saccharomyces-Stämme der Ploidieklassen p = 1 bis 4 51
3.1.1.1. Ergebnisse 51
3.1.1.2. Diskussion 52
3.1.2. Die Röntgenstrahlen-induzierte Mutabilität verschiedener Saccharomyces-Stämme 55
3.1.2.1. Mutationsraten als Funktion des genetischen Hintergrundes 55
3.1.2.2. Mutationsraten als Funktion des Ploidiegrades 63
3.1.2.3. Diskussion 68
3.1.3. Die UV-induzierte Mutabilität in einem System fast homozygoter und isogener Saccharomyces-Stämme 75
3.1.3.1. Ergebnisse 76
3.1.3.2. Genetische Untersuchung haploider, prototropher UV-induzierter Mutanten 79
3.1.3.3. Diskussion 82
3.2. Zur Induktion rezessiv letal wirkender Mutationen in "haploiden" und diploiden Saccharomyces-Stämmen 89
3.2.1. Ergebnisse 89
3.2.2. Diskussion 93
3.3. Zur strahleninduzierten Entstehung homozygoter Linien in heterozygoten Saccharomyces-Stämmen 96
3.3.1. Häufigkeit der Auftretens auxotropher Kolonien als Funktion der Dosis und des Centromerabstandes der Markierungsgene nach Röntgen- und UV-Bestrahlung 98

3.3.2. Zum Mechanismus der Entstehung homozygot auxotropher Zellen in heterozygot markierten prototrophen Stämmen nach Bestrahlung . . . 104
3.3.3. Diskussion unter besonderer Berücksichtigung der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" 108
3.4. Überprüfung des Kriteriums "Koloniebildungsfähigkeit = Freiheit von letal wirkenden strahleninduzierten Zuständen" anhand von Teilungsstammbäumen 112
3.4.1. Ergebnisse der TSB-Kontrollen 113
3.4.2. Ergebnisse der Teilungsstammbäume nach UV . . 113
3.4.3. Ergebnisse der Teilungsstammbäume nach Röntgenbestrahlung 117
3.4.4. Diskussion 118

4. Zusammenfassende Diskussion 124
4.1. Diskussion einiger Ansätze und Ergebnisse zur Überprüfung bestimmter Voraussetzungen des von STEIN u. LASKOWSKI entworfenen Modells zur Deutung der Röntgen- und UV-Inaktivierung von Saccharomyces 124
4.2. Derzeitiger Stand der modellmäßigen Erklärung der Strahlen-Inaktivierung von Saccharomyces . 129

5. Zusammenfassung 140

6. Literatur 142

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0011

1. Die Deutung der strahleninduzierten Inaktivierung bei Saccharomyces unter besonderer Berücksichtigung genetischer Veränderungen.

Bei der Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung von Mikroorganismen ergibt sich prinzipell das Problem, aus den wenigen beobachtbaren Änderungen wie Hemmung der unbeschränkten Teilungsfähigkeit, Veränderung bestimmter Stoffwechselprozesse, Umwandlung gewisser biochemischer Strukturen etc. ausreichend Information für eine Klärung der Ursachen der Inaktivierung zu sammeln. Daher liegt bisher kein einheitliches Modell vor, welches es ermöglicht, allgemeine Aussagen über die Inaktivierung von Mikroorganismen zu machen. Es sind vielmehr nur einzelne Komponenten der Inaktivierung ermittelt worden[1]. Insbesondere erscheint gesichert, daß sowohl genetische Effekte (siehe z.B. PATEMAN 1960, MORTIMER 1955 u. 1961, SOMMERMEYER 1959) als auch Veränderungen außerhalb des Genoms (siehe z.B. LINDEGREN, PITTMAN, YUASA 1959, WASCH 1961, SPOERL et al. 1964) Beiträge zur Inaktivierung liefern können.
Ein Modell der Mikroorganismen-Inaktivierung müßte zum einen Aussagen machen über die Anteile der verschiedenen Komponenten und zum anderen eine molekulare Erklärung der verschiedenen zur Inaktivierung führenden Mechanismen geben. Während vor allem durch zahlreiche Arbeiten an Bakterien und die in vitro Untersuchungen der Veränderungen von Zellkomponenten zahlreiche Mechanismen bekannt geworden sind, die für die Inaktivierung von Mikroorganismen verantwortlich sind, stößt die Beurteilung der relativen Bedeutung der einzelnen Effekte auf Schwierigkeiten. Eine Separation der Anteile wird besonders dadurch erschwert, daß eine inaktive Zelle per definitionem keine Nachkommen

---

1) Ausführliche Darstellungen der Komponenten der Inaktivierung von Mikroorganismen finden sich z.B. bei SOMMERMEYER 1959, DESSAUER u. SOMMERMEYER 1964.

liefert und daher weitere direkte Untersuchungen der strahleninduzierten Veränderungen unmöglich sind. Dies gilt insbesondere für haploide Zellen; in di- oder polyploiden Zellen ist es im Prinzip möglich, gewisse Strahlenschäden zu kompensieren und einer Analyse zuzuführen. Es erschien daher sinnvoll für die Analyse der Inaktivierung Organismen zu benutzen, die sowohl in der Haplo- als auch in der Polyphase kultivierbar sind. Als hierfür besonders geeignet erwies sich Saccharomyces, daneben mit Einschränkungen Neurospora crassa sowie einige stabile Zellkulturen mit unterschiedlichem Chromosomensatz.
Im Gegensatz zu den bei Bakterien möglichen Techniken stehen bisher bei diesen Organismen erfolgreiche Transduktionsexperimente mit möglicherweise existierenden Viren (bzw. Phagen)[1] und geglückte Transformationsexperimente als analytische Techniken nicht zur Verfügung. Dieser methodische Nachteil wird durch die für Saccharomyces und Neurospora crassa relativ gut bekannte chromosomale Ordnung des genetischen Materials zum Teil ausgeglichen.

Besonders eingehende Untersuchungen über die zur Inaktivierung führenden Mechanismen wurden an Serien haploider bis octoploider Saccharomyces-Stämme durchgeführt (siehe z.B. SARACHEK u. LUCKE 1953, MORTIMER 1958 u. 1961, LASKOWSKI 1960 u. 1962a). Aus diesen Arbeiten kann als gesichert entnommen werden, daß dominant und rezessiv letal wirkende genetische Effekte an der Röntgeninaktivierung beteiligt sind. Über Struktur und Wirkungsweise der dominanten Letalmutation sowie über die für nicht genetischen Wirkungen verantwortlichen Veränderungen besteht noch weitgehende Unklarheit. - Die Mutabilität sowohl rezessiv letal wirkender als auch anderer Gene wurde eingehender untersucht (LASKOWSKI u. HAEFNER 1963 und HAEFNER u. LASKOWSKI

---

1) Über einen möglicherweise in Saccharomyces kultivierbaren Phagen berichtete LINDEGREN, BANG, HIRANO 1962

1963), ohne jedoch bisher zu einer Aufklärung von Funktion und Größe rezessiv letal wirkender Gene zu führen.

Bisher ist deshalb auch die für Saccharomyces vorliegende Interpretation der Inaktivierungsexperimente stark phänomenologischer Natur. Sie zeichnet sich gegenüber den für die Inaktivierung von Bakterien angebotenen Deutungen dadurch aus, daß sie unter Ausnutzung der Untersuchungen mit Stämmen verschiedenen Ploidiegrades gewisse Aussagen über die relative Bedeutung der Einzeleffekte ermöglicht und experimentell überprüfbare Konsequenzen besitzt.
Im folgenden soll ein sehr knapper Abriß der bisher bekannten Ergebnisse über die Inaktivierung von Saccharomyces und deren Deutung durch Modellvorstellungen gegeben werden[1]. Hierbei werden bewußt nur die in dieser Arbeit interessierenden Wirkungen von Röntgenstrahlen und ultraviolettem Licht der Wellenlänge 254 nm (UV) diskutiert. Eine getrennte Diskussion für diese beiden Strahlenarten erscheint nötig, da zum einen für ionisierende Strahlen ein wesentlich umfangreicheres Material vorliegt und zum anderen bekannt ist, daß Röntgenstrahlen und UV über unterschiedliche Primärprozesse wirken[2].

1.1. Inaktivierung durch Röntgen-Strahlen

Ein Modell für die Inaktivierung von Saccharomyces durch Röntgenstrahlen muß in der Lage sein, folgende wichtige experimentellen Ergebnisse zu erklären:
a) Die LD_{10}[3] nimmt bei weitgehend genetisch ähnlichen Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades (p) von

---

1) Ausführliche Darstellungen des Problems der Inaktivierung von Saccharomyces finden sich z.B. bei: MAGNI 1959, LASKOWSKI 1964, MORTIMER 1961, GREVE 1959, DESSAUER u. SOMMERMEYER 1964.

2) Eine Übersicht über die unterschiedliche Primärwirkung von ionisierenden Strahlen und UV findet sich z.B. bei Harbers 1964.

3) LD_{10} = Dosis, bei der 10 % der bestrahlten Zellen überleben, also makroskopische Kolonien bilden.

p = 1 bis p = 2 bzw. 3 zu, um mit steigendem p wieder abzunehmen.[2] Haplonten zeigen in halblogarithmischen Raster lineare, di und polyploide Stämme sigmoide Inaktivierungskurven (siehe z.B. MORTIMER 1961, LASKOWSKI 1960 u. 1962a u. b).

b) Werden haploide Saccharomyces-Zellen mit Röntgenstrahlen bestrahlt und anschließend mit unbestrahlten Haplonten zur Kopulation gebracht, so sind die diploiden Zygoten bei Dosen, die den Haplonten auf z.B. 0,1 % inaktivieren, zu einem hohen Prozentsatz vital (MORTIMER 1955, OWEN u. MORTIMER 1956), sofort anschließende Sporulation der Zygoten ergibt jedoch nur bei einem Prozentsatz der Zygoten Asci mit letalen Sporen, der weit unter dem Prozentsatz der Inaktivierung des betreffenden Haplonten liegt (siehe z.B. bei MAGNI 1959). Die Tetradenanalyse bestrahlter Diplonten ergibt ebenfalls letale Ascosporen, also ebenfalls den Nachweis von rezessiven Letalmutationen (z.B. JAMES 1959)[1]. Wenn für das Paarungstypallel homozygote Diplonten mit unbestrahlten Haplonten zur Kopulation gebracht werden, so ist ein relativ hoher Prozentsatz der Zygoten nicht in der Lage, zu makroskopischen Kolonien aufzuwachsen (MORTIMER u. OWEN 1956 und OWEN u. MORTIMER 1956).

c) Für Mutationen, die nur im hemi- oder homozygoten Zustand letal wirken (rezessive Letalmutationen), wurden in Diplonten Mutationsraten in der Größenordnung 10^{-1} bei relativ kleinen Röntgendosen ermittelt (LASKOWSKI u. HAEFNER 1963), während für Mutationen von der Prototrophie zur Auxotrophie (MAGNI 1962b) und vice versa (HAEFNER u. LASKOWSKI 1963) um ca. zwei Zehnerpotenzen kleinere gefunden wurden.

d) Über eine mit der Häufigkeit von rezessiven Letalmutationen vergleichbare Häufigkeit von röntgenstrahleninduzierten Chromosomen-Anomalien wurde bisher nicht berichtet. Die

---

1) Rezessive Letalmutationen wurden auch zuerst von ATWOOD u. MUKAI 1954 nach Röntgenbestrahlung von (heterokaryotischen) Konidien von Neurospora crassa gefunden.

2) BARSUKOV et al. 1963 fanden, daß in einem nicht isogenen Stammsystem Tetraplonten resistenter als Triplonten sind.

im V. Chromosom von Saccharomyces durchgeführten Untersuchungen, ergaben ebenfalls kein entsprechendes Ausmaß an Deletionen (MAGNI persönliche Mitteilung).
e) Die Röntgenstrahlenempfindlichkeit haploider Saccharomyces-Stämme wird durch Veränderung der Milieubedingungen nach der Bestrahlung wesentlich weniger stark beeinflußt wie die der Di- oder Polyplonten (PATRICK, HAYNES, URETZ 1962 u. 1964). - Der O_2-Effekt ist ploidiegradunabhängig und hat einen Dosisreduktionsfaktor von ca. 2 (BIRGE u. TOBIAS 1954).-Für Diplonten ist bekannt, daß bereits die Mutation an einem einzigen Gen die Röntgenempfindlichkeit verändern kann (aα-Effekt: LASKOWSKI 1962c; AS-Effekt: LASKOWSKI 1962b). Eine bestimmte Gruppe genetischer Veränderungen bewirkt in haploiden Stämmen einen Anstieg der Röntgenstrahlenresistenz über die des zugehörigen Diplonten hinaus, wobei gleichzeitig der Kurvencharakter verändert wird (MOUSTACCHI u. MARCOVICH 1962). - Die in der diploiden Phase wirksamen Gene ergeben keine Veränderung der Röntgenstrahlenempfindlichkeit in der Haplophase und umgekehrt.

f) Röntgenstrahleninaktivierte Saccharomyces-Zellen verschiedenen Poidiegrades bleiben nach der Bestrahlung nicht nur als Einzelzellen liegen, sie machen Dosis- und Ploidiegradabhängige Restteilungen durch (siehe z.B. LASKOWSKI u. STEIN 1960, KOROGODIN 1958).
g) Die Untersuchung von Stoffwechselprozessen und Enzymaktivitäten von Saccharomyces nach Röntgenbestrahlung ergab, daß erst bei hohen Dosen, bezogen auf die Inaktivierung, deutliche Schädigungen der Physiologie der Zelle auftreten (HEMPEL u. LASKOWSKI 1964, WASCH 1961 , ROTHSTEIN 1959, NICKEL 1964, Zusammenfassung z.B. bei HEMPEL 1964).

Aufgrund von experimentellen Ergebnissen des Typs a) und f) sowie unter Berücksichtigung der von MORTIMER 1952 vorgeschlagenen Separation der genetischen Strahleneffekte in dominant und rezessiv letal wirkende, entwarfen STEIN u. LASKOWSKI 1958 u. 1960 ein mathematisches Modell zur Deutung der Röntgeninaktivierung von Saccharomyces, wobei die

strukturellen und molekularen Veränderungen als letztliche Ursache der Inaktivierung nicht berücksichtigt wurden. Dieses Modell hat die Möglichkeit einer quantitativen Aufklärung der Anteile genetischer und extrachromosomaler Strahlenschäden.

In einem Dosisbereich bis zu Dosen, die bei Haplonten bis zu ca. 1 % Überlebende ergeben, kann man das Ergebnis der für das benutzte System weitgehend homozygoter und isogener Saccharomyces-Stämme durchgeführten Analyse in großen Zügen folgendermaßen darstellen: In haploiden Stämmen wirken hauptsächlich rezessive, in Di- und Polyplonten dominante Letalmutationen, der Anteil nicht genetischer Effekte ist unabhängig vom Ploidiegrad relativ klein. Es existieren ca. 100 hochmutable Cistren, deren Mutationen rezessiv letal wirken, diese mutieren mit mittleren Mutationsraten von max. ca. $5 \cdot 10^{-2}$.

Um mit den z.Z. der Analyse experimentell vorliegenden Tatsachen Aussagen machen zu können, waren STEIN u. LASKOWSKI von vornherein gezwungen, ein allgemeines Modell (dargelegt in LASKOWSKI 1961), so einzuschränken, daß es nur wenige Unbekannte besaß. Diese Einschränkung machte es nötig, eine Reihe von plausiblen, aber unbewiesenen Voraussetzungen in den Aufbau einer Gleichung für die Überlebenswahrscheinlichkeit

$$(1) \qquad \ddot{U}_p = \varphi_o \cdot \varphi_p (1-t^p)^m W^p$$

aufzunehmen ($\ddot{U}_p$ = Überlebenswahrscheinlichkeit eines Stammes des Ploidiegrades p, φ_p ploidiegradabhängiger und φ_o ploidiegradunabhängiger Anteil der Überlebenswahrscheinlichkeiten, die auf nicht genetische Effekte zurückgehen, $1-W^p$ = Inaktivierungswahrscheinlichkeit durch dominante Letalmutationen, m = mittlere Zahl der Gene, die zu rezessiv letal wirkenden Zuständen mutieren können, und t deren mittlere Mutationswahrscheinlichkeit; näheres siehe STEIN u. LASKOWSKI 1960). Die wichtigsten dieser Voraussetzungen waren:

a) "Überlebende", also Zellen, die makroskopische Kolonien bilden können, sind frei von letal wirkenden Veränderungen.
b) Es gibt zwischen den einzelnen zur Inaktivierung führenden Effekten keine Wechselwirkung.
c) Die Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz für Mutationen zu letal wirkenden Zuständen sind in weitgehend isogenen und homozygoten Systemen von Saccharomyces-Stämmen verschiedener Ploidiegrade konstant.
d) "Plasmatisch geschädigt" sind die und nur die Zellen, die nach der Bestrahlung keinerlei Teilungen mehr durchführen.
e) Rezessiv letal wirken nur Mutationen an einzelnen Cistren. Die Inaktivierung durch das Zusammenwirken von Mutationen an mehreren Cistren wird nicht berücksichtigt.

Inwieweit sich diese Voraussetzungen durch das bisher aus der Literatur bekannte Material stützen lassen, und ob es möglich ist, kritische Experimente zu ihrer Überprüfung zu machen, soll in 1.3. besprochen werden. Wie die vorliegenden Ergebnisse und die Ergebnisse aus der Literatur durch ein modifiziertes Modell interpretierbar sind, wird in 4.2. angegeben.

1.2. Inaktivierung durch ultraviolettes Licht (254 nm)

Während für die Inaktivierung von Saccharomyces durch ionisierende Strahlen ein umfangreiches Material vorliegt, ist über die UV-Wirkung weniger gearbeitet worden. Dies hat zur Folge, daß ein Modell für die UV-Inaktivierung auf der einen Seite weniger Information zur Verfügung hat, auf der anderen Seite aber auch nicht so differenzierte Ergebnisse zu erklären braucht. Kurz zusammengefaßt sind folgende experimentellen Ergebnisse von Wichtigkeit:
a) Die LD_{10} nimmt in Systemen weitgehend genetisch ähnlicher Stämme verschiedenen Ploidiegrades von p = 1 zu p = 3 zu, um dann für p = 4 bis 6 nur noch sehr wenig abzunehmen. Alle Inaktivierungskurven sind in halblogarithmischer Darstellung nicht linear (SARACHEK u. LUCKE 1953, LASKOWSKI 1960 u. 1962a u. b).

b) Bei Bestrahlung von Diplonten und anschließender Tetradenanalyse erhält man Asci mit letalen Sporen (LASKOWSKI u. HAEFNER unveröffentlicht)[1].

c) Die UV-Empfindlichkeit wird durch Veränderung der Milieubedingungen nach der Bestrahlung sowie durch Nachbestrahlung mit sichtbarem Licht (Fotoreaktivierung) für Stämme aller Ploidieklassen in ähnlicher Weise verändert (WARSHAW 1952, SARACHEK 1954, PITTMAN u. PEDIGO 1959, PATRICK, HAYNES, URETZ 1962 u. 1964). Kleine Veränderungen im Genom von Stämmen gleichen Ploidiegrades ergeben keinen Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (LASKOWSKI 1960 u. 1962b, MOUSTACCHI u. MARCOVICH 1962), insbesondere wirken die die Röntgenempfindlichkeit verändernden Gene nicht auf die UV-Resistenz.

d) UV-bestrahlte Saccharomyces-Zellen ergeben Dosis- und Ploidiegradabhängige Restteilungen (LASKOWSKI u. STEIN 1958 u. 1960).

e) Bestimmte physiologische Prozesse in Saccharomyces-Zellen werden von UV-Dosen beeinflußt, die zu relativ kleinen Inaktivierungen führen (ALDOUS u. STEWART 1952), andere können erst durch hohe Dosen beeinflußt werden (HEMPEL u. LASKOWSKI 1964).

In ähnlicher Weise wie für ionisierende Strahlen wandten STEIN u. LASKOWSKI 1960 ihr Modell auch auf die UV-Inaktivierungskurven von weitgehend homozygoten und isogenen Saccharomyces-Stämmen unterschiedlichen Ploidiegrades an. Dabei wurde zusätzlich zu den unter 1.1. zusammengestellten Voraussetzungen angenommen, daß auch nach UV-Bestrahlung dominant wirkende Letalmutationen auftreten, d.h. daß die unmittelbar nach der Bestrahlung durchgeführte Kopulation zwischen UV-bestrahlten und unbestrahlten Haplonten zu letalen Zygoten führt; Experimente dieser Art sind bisher nicht publiziert worden.

---

1) Die Induktion rezessiv letal wirkender Mutationen durch UV wurde auch bei Neurospora crassa gefunden (PATEMAN 1960).

Die von STEIN und LASKOWSKI durch Anwendung ihres Modells gewonnenen Resultate führen in einem Dosisbereich der bis zu Dosen reicht, die bei Diplonten ca. 1 % Überlebende ergeben, zu folgendem Bild der UV-Inaktivierung: Haplonten werden hauptsächlich durch rezessive Letalmutationen inaktiviert, Diplonten durch die ungefähr gleich starke Wirkung von rezessiven und dominanten Letalmutationen. Nicht genetische Effekte sind bei kleineren Dosen im Haplonten stärker an der Inaktivierung beteiligt als bei Diplonten. Für die mittlere Zahl der Loci, die zu rezessiv letal wirkenden Gen-Zuständen mutieren, ergibt sich ein Wert von ca. 20, die pro Gen über alle Gene gemittelte Mutationsrate für derartige Zustände erreicht bei einer Dosis die 1 % Überlebende im Haplonten ergibt, Werte von ca. 0,15.

1.3. Diskussion der Voraussetzungen und ungeklärten Fragen, die sich aus der Aufstellung eines mathematischen Modells für die Inaktivierung von Saccharomyces ergeben.

Problemstellung

Wie bereits erwähnt liegt für ein allgemeines Bild der Saccharomyces-Inaktivierung nur das von STEIN und LASKOWSKI entworfene Modell vor. Die wichtigsten Voraussetzungen für den Aufbau dieses Modells sind in 1.1. für die Inaktivierung durch Röntgenstrahlen und in 1.2. für die UV-Inaktivierung zusammengestellt. Im folgenden soll geprüft werden, inwieweit diese Voraussetzungen durch die aus der Literatur bisher bekannten experimentellen Ergebnisse gestützt werden, inwieweit Experimente zu ihrer Prüfung durchführbar sind und welche dieser Versuche in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden sollen.

Zu Voraussetzung a) - "Überlebende", d.h. Zellen, die makroskopische Kolonien bilden, sind frei von letal wirkenden Veränderungen: Diese fundamentale Annahme wurde bisher für jede und insbesondere die "treffer- bzw. treffbereichstheoretische" Diskussion aller Inaktivierungskurven von Mikroorganismen gemacht, da die zu prüfende Reaktion "Bildung

makroskopischer Kolonien" experimentell einfach überprüfbar ist (siehe z.B. ZIMMER 1960, HUG u. KELLERER 1963, SOMMERMEYER 1959, ALPER, GILLIES, ELKIND 1960). Nach den Ergebnissen von SWANN 1962 an Schizosaccharomyces und MILTENBURGER u. BAUCHINGER (persönliche Mitteilung) an Zellkulturen in vitro, die beobachteten, daß auch aus Zellen, die im Endeffekt zu makroskopischen Kolonien aufwachsen, letale Nachkommen entstehen, kann diese Voraussetzung nicht als allgemein gültig hingenommen werden.
Ist ein großer Teil der Zellen, die später zu makroskopischen Kolonien aufwachsen, primär Träger von letal wirkenden Zuständen, und entstehen die makroskopischen Kolonien dadurch, daß die vorhandenen Letalfaktoren innerhalb der ersten Generation "geschickt" in wenigen letalen Zellen "gesammelt" werden, während die anderen sich weiter teilen, oder kommt es zu Reaktivierungen in einigen Zellen, so ist das Kriterium "Überlebende" mehr ein Maß für einen Verteilungs- oder spezifischen Reaktivierungsmechanismus als für die primär gesetzten Letaleffekte.
Um einen genaueren Einblick in die quantitativen Verhältnisse über das Auftreten von vitalen Klonen mit letalen Zellen zu bekommen, ist es nötig, das Schicksal der Nachkommen von bestrahlten Einzelzellen im Rahmen von Teilungsstammbäumen zu untersuchen. Dies ist insbesondere bei Saccharomyces wegen der technisch günstigen Zellgröße und Generationsdauer möglich. - Die unter 3.5. in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse derartiger Experimente sind in Übereinstimmung mit den oben zitierten Befunden.
Zu Voraussetzung b) - Ungestörte Superponierbarkeit der verschiedenen Inaktivierungsprozesse: Um Ansätze der Art wie Gleichung (1) machen zu können, ist es nötig, auf Interferenzglieder, die die Wechselwirkung zweier Inaktivierungsprozesse berücksichtigen, zu verzichten. Dieser Verzicht ist nicht von vornherein plausibel, da zahlreiche Wechselwirkungen anhand der experimentellen Befunde denkbar sind.

Als Wechselwirkung zwischen "plasmatischer Inaktivierung" und Inaktivierung durch rezessiv letale Effekte ist z.B. vorstellbar, daß die Inaktivierung der DNS-Reduplikationsenzyme ohne gleichzeitige Inaktivierung der den Aufbau dieser Enzyme steuernden Gene zu einer Teilungsverzögerung führt, die die von bald nach der Bestrahlung einsetzender DNS-Synthese abhängige Manifestierung von Mutationen verhindert. - Eine Wechselwirkung zwischen rezessiven und dominanten Letalmutationen ergibt sich z.B., wenn man annimmt, daß einige rezessive Letalmutationen terminale Deletionen sind. Nicht homologe Deletionen brauchen im Diplonten nicht zur Inaktivierung zu führen, verkleben jedoch die Isochromatidenbruchstellen, so ist eine die Mitose störende Brükkenbildung denkbar, die zur Inaktivierung führen kann. - Denkt man bei nicht genetischen Effekten z.B. an strahleninduzierte Störungen im Centrosom, welches unabhängig vom Ploidiegrad jeweils nur einfach vorhanden ist (YUASA u. LINDEGREN 1959), so kann man leicht Vorstellungen entwikkeln, in denen Mitosestörungen entstehen, die allein nicht inaktivierend wirken, aber gemeinsam mit bestimmten Chromosomenanomalien, die ebenfalls allein nicht letal sind, zur Inaktivierung führen.

Wichtige Grundannahme aller dieser Wechselwirkungen ist es, daß sich die Strahlenwirkungen in zwei gestörten Bereichen so ergänzen, daß die unbeschränkte Teilungsfähigkeit unterbunden wird. Eine größere Beteiligung derartiger Effekte an der Inaktivierung müßte nichtlineare Inaktivierungskurven in halblogarithmischer Darstellung ergeben. Für Röntgenstrahlen sind bisher bis auf eine Gruppe von Ausnahmen (MOUSTACCHI u. MARCOVICH 1962), nur lineare Inaktivierungskurven für Haplonten publiziert worden, während die Rö-Inaktivierungskurven für alle anderen Ploidiegrade sowie alle UV-Inaktivierungskurven nicht linear sind. Die Vernachlässigung von Wechselwirkungsgliedern bei der Beschreibung der Röntgeninaktivierung von Haplonten erscheint daher gerechtfertigt.

Die Angabe von kritischen Experimenten zur Klärung dieses Problems ist schwierig, da die Zusammenhänge zwischen Struktur und Stoffwechsel in der Zelle noch weitgehend ungeklärt sind. Möglicherweise werden bessere cytologische Untersuchungen[1], sowie eine bessere Kenntnis des Apparates der Proteinsynthese Einblicke in diesen Komplex liefern, der in dieser Arbeit nicht untersucht werden soll.

Zu Voraussetzung c) - Strahleninduzierte Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz sind unabhängig vom Ploidiegrad der Zelle, in der sie bestimmt werden: Als sehr wesentlich geht die Voraussetzung der Ploidiegradunabhängigkeit der Mutationsraten t bzw. W in das Modell von STEIN und LASKOWSKI ein.

Aus der Literatur sind bisher zahlreiche Arbeiten bekannt, in denen die Auslösung von Chromosomenaberrationen verschiedener Typen in Serien di-, tetra- und teilweise hexaploider Pflanzenzellen bestimmt wurden, und die stets eine ploidiegradunabhängige Rate von Aberrationen pro Chromosom bzw. Chromosomensatz gefunden haben (z.B. CONGER u. JOHNSTON 1956, BHASKARAN u. SWAMINATHAN 1962, SWAMINATHAN u. NATARAJAN 1957 siehe auch 4.2.). Daneben wurde berichtet, daß die Mutationsraten für morphologisch bei Pflanzen erkennbare Mutationen sowohl mit dem Ploidiegrad zu- als auch abnehmen können (MÜNTZIG 1942, MAC KEY 1954 und NATARAJAN, SIKKA, SWAMINATHAN 1958). Die Interpretation dieser Arbeiten wird dadurch erschwert, daß häufig die Dominanzverhältnisse der aufgetretenen Mutationen sowie ihre nähere genetische Klassifizierung fehlen. - Für dominante Letalmutationen in Spermien von Marmoniella fanden MORTIMER u. von BORSTEL 1963 einen Anstieg der Mutationsrate um den Faktor 2 von der Haplo- zur Diplophase.

---

1) Eine Übersicht über die bisherigen cytologischen Befunde an Saccharomyces findet sich z.B. bei MARQUARDT 1962.

Lassen diese Befunde die gemachte Voraussetzung für Röntgenstrahlen recht plausibel erscheinen, so ist eine direkte Überprüfung bei Saccharomyces für Röntgenstrahlen und UV sowohl nötig als auch möglich. Um die gemachte Voraussetzung der Ploidiegradunabhängigkeit von Mutationsraten an Mutationen zu letal wirkenden Zuständen zu untersuchen, bedarf es komplizierter Versuche. So ist es prinzipiell möglich, die Raten für das Auftreten von rezessiven Letalmutationen in di- und tetraploiden Saccharomyces-Stämmen durch Tetradenanalyse bestrahlter Di- und Tetraplonten zu bestimmen (LASKOWSKI unveröffentlicht). Dieser Weg ist sehr aufwendig und ergibt, bedingt durch die höhere spontane Avitalität der Sporen von Stämmen höheren Ploidiegrades, schwierig deutbare Ergebnisse.
Einfacher, wenn auch für Aussagen über die Ploidiegradabhängigkeit von W und t weniger typisch, sind Experimente, in denen die Ploidiegradabhängigkeit der Mutabilität spezifischer für bestimmte Stoffwechselprozesse verantwortlicher Gene in Stämmen verschiedener Ploidiegrade untersucht wird. - Experimente dieses Typs, und zwar für Mutationen von der Auxotrophie zur Prototrophie sollen in dieser Arbeit zur Kontrolle der Voraussetzung c) gemacht werden[1]).
Zu Voraussetzung d) - "Plasmatisch geschädigt" sind die und nur die Zellen, die nach der Bestrahlung keinerlei Restteilungen durchführen: Für hohe Röntgendosen konnte für einen diploiden Saccharomyces-Stamm eine Korrelation zwischen Anteil der im Einzellstadium liegenbleibenden Zellen und der Atmungs- und Gärungsaktivität gefunden werden, während für UV selbst bei sehr hohen Dosen keine derartige Beziehung besteht (HEMPEL u. LASKOWSKI 1964). Für den hier interessierenden Dosisbereich geben die Röntgen-Experimente keinen Hinweis auf die Richtigkeit dieser Voraussetzung,

---

1) Die Ergebnisse der kürzlich erschienenen Arbeit von ARMAN u. ARDASCHNIKOW 1964, in denen über ähnliche Untersuchungen an haploiden und diploiden Saccharomyces-Stämmen berichtet wird, werden in 3.1.2.3. und 3.1.3.3. besprochen.

da bei der verwendeten Methode der Messung der Atmung bzw. Gärung aller bestrahlten Zellen nicht festzustellen ist, ob nur die Aktivität der später im Einzellstadium liegenbleibenden Zellen sehr stark sinkt oder ob alle Zellen gleichmäßig einen von ihrem späteren Restteilungszustand unabhängigen Abfall der Aktivität zeigen. Außerdem wurden die Untersuchungen unmittelbar nach der Bestrahlung durchgeführt, während eine Differentiation in Einzelzellen und Nicht-Einzelzellen erst einige Stunden nach der Bestrahlung zu beobachten ist.
Es scheint auch nicht gerechtfertigt aus der von verschiedenen Autoren gemachten Beobachtung, daß sich bei sehr hohen Dosen plasmatische Schäden und Liegenbleiben im Einzellstadium korrelieren lassen (siehe z.B. ROTHSTEIN 1959), den Schluß zu ziehen, daß diese Korellation auch für kleine Dosen besteht, da für hohe Dosen auch die anderen (genetischen) Inaktivierungsmechanismen sehr stark zum Tragen kommen und gar nicht auszuschließen ist, daß die beobachteten plasmatischen Schäden Folgen derartiger Effekte sind.

In kritischen Experimenten zur Überprüfung der Voraussetzung d) müßte man a) zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung sowohl Stoffwechselaktivität als auch nachweisbare genetische Schäden von auf der eine Seite Einzel- und auf der anderen Seite sich restteilenden Zellen untersuchen, wobei eine Trennung dieser beiden Typen durch geeignete Methoden wie z.B. fraktioniertes Zentrifugieren nötig wäre; b) erscheint es sinnvoll festzustellen, ob es andere sicher nicht plasmatische Inaktivierungsmechanismen gibt, die ebenfalls zum Liegenbleiben der Zellen im Einzellstadium führen; c) sollte untersucht werden, ob es Inaktivierungsmechanismen gibt, die den Charakter plasmatischer Effekte aufweisen, aber nicht zur Inaktivierung im Einzellstadium beitragen; d) würden quantitative Experimente über Reaktivierung durch Kopulation mit unbestrahlten Zellen nach der Bestrahlung Aufschlüsse ermöglichen, wieviele der normalerweise im Einzellstadium liegenbleiben-

den Zellen frei von genetischen Schäden sind.
In dieser Arbeit werden einige Ergebnisse von Experimenten des Typs b) u. c) mitgeteilt.
Zur Voraussetzung e) - Ausschluß polygen, rezessiv letal wirkender Mutationen als Inaktivierungsursache: In dem von STEIN u. LASKOWSKI gemachten Ansatz über die Wirkung von rezessiven Letalmutationen kommt zum Ausdruck, daß nur rezessiv letale Wirkungen auftreten, wenn im haploiden Genom ein Gen oder im di- bzw. polyploiden Genom alle homologen Gene mutieren. Die möglicherweise polygene rezessive Inaktivierung durch z.B. zwei nicht-homologe, jeweils allein nicht inaktivierend wirkende Gene wird nicht berücksichtigt. Praktisch von Bedeutung ist diese mögliche Art der Inaktivierung in Haplonten, sie müßte, bezogen auf den Diplonten, zu einer größeren Strahlensensibilität und - falls derartige polygene Inaktivierungen einen größeren Anteil an der Inaktivierung haben - zu nicht exponentiellen Inaktivierungskurven des Haplonten führen.
Die Tetradenanalyse bestrahlter und anschließend zur Sporulation gebrachter Diplonten sollte Aufschlüsse über eine polygene Wirkung ermöglichen. Die aus der Literatur bekannten Werte für die Vitalität der Sporen röntgenbestrahlter Diplonten sind z.T. wegen der hohen spontanen Letalität der Sporen schlecht auswertbar (JAMES 1959), oder sie enthalten nur Werte für die Diplonten, in denen eine oder mehrere monogen rezessiv wirksame Letalmutationen vorhanden sind (OWEN u. MORTIMER 1956, MAGNI 1959). In dieser Arbeit soll versucht werden, aus Tetradenanlysen bestrahlter Diplonten nähere Aufschlüsse über die Segregation von rezessiv letal wirkenden Zuständen und dadurch Hinweise über die Richtigkeit der Voraussetzung e) zu erhalten.
Faßt man die Diskussion der von STEIN u. LASKOWSKI für ein mathematisches Modell der Saccharomyces-Inaktivierung gemachten Voraussetzungen zusammen, so zeigt sich, daß diese im Prinzip experimentell überprüfbar sind. Eine derarti-

ge Überprüfung steht bisher aus. In der vorliegenden Arbeit werden Experimente und Ergebnisse mitgeteilt, die zur Bestätigung oder Einschränkung dieser Voraussetzungen führen. - Insbesondere sei hier betont, daß gerade der Aufbau eines wahrscheinlich zu einfachen Modells für die Inaktivierung von Saccharomyces Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen werden konnte, wodurch im Endeffekt ein besseres Verständnis der Inaktivierungsmechanismen ermöglicht wird.
Neben den Untersuchungen der Voraussetzung steht die Klärung eines Widerspruchs offen, der sich aus der von STEIN u. LASKOWSKI durchgeführten Analyse und Werten aus der Literatur ergibt. Nach STEIN u. LASKOWSKI werden sowohl nach Röntgen- als auch nach UV-Bestrahlung Haplonten in den untersuchten Dosisbereichen hauptsächlich durch rezessive Letalmutationen inaktiviert. Daraus folgt, daß in den Tetraden, die sich durch Sporulation bestrahlter Diplonten ergeben, bei Dosen, die die Haplonten stark inaktivieren ($\ddot{U} < 1\%$), sehr zahlreiche haploide letale Sporen auftreten müssen. Dies ist jedoch weder für Röntgenstrahlen (Zusammenfassung siehe MORTIMER 1961) noch für UV (LASKOWSKI u. HAEFNER unveröffentlicht) der Fall. Es werden stets wesentlich weniger letale Sporen gefunden als nach dem von STEIN u. LASKOWSKI entworfenen Modell zu erwarten sind. -
MORTIMER 1961 bietet zur Erklärung dieses experimentellen Befundes zwei Modelle an: a) In Diplonten kommt es zu einer Reaktivierung rezessiver Letalmutationen bzw. zu einer geringeren Manifestierung dieser Mutationen (also Ploidiegradabhängigkeit von t bzw. m), oder es gibt b) einen bisher unbekannten strahleninduzierten Prozess, der bevorzugt einen Beitrag zur Inaktivierung der Haplonten liefert. Sowohl eine Deutung nach a) als auch nach b) müßte zu einer Variation des von STEIN u. LASKOWSKI angegebenen Formalismus führen.
Es erschien daher sinnvoll, nach Experimenten zu suchen, die eine Entscheidung zwischen a) und b) möglich macht oder andere Deutungen sinnvoll erscheinen läßt. Einige derartige Versuche sowie bestimmte Ergebnisse werden hier vorgelegt.

2. Methode

Im folgenden werden die experimentell in dieser Arbeit wichtigen Verfahren und Saccharomyces-Stämme angegeben. Außerdem finden sich unter den betreffenden Rubriken die rechnerischen Verfahren, die angewandt wurden, um die unter 3. mitgeteilten Ergebnisse aus den experimentellen Meßwerten zu ermitteln.

2.1. Stämme

Einen Überblick über die für die verschiedenen Gruppen von Experimenten verwendeten Stämme gibt Tabelle 1.
Die Stämme 211-1aM, 211-1aM/2, 230, 301, 401, 211-1bN, 211-1bN/2, 219, 300, 400 u. 230-1c/2 wurden von LASKOWSKI aufgebaut, ihr Ploidiegrad sowie sonstige Eigenschaften wurden genau untersucht (LASKOWSKI 1962a). Diese Stämme waren nach den im Jahre 1961 abgeschlossenen Untersuchungen "weitestgehend" homozygot und isogen.
Inwieweit sich diese Stämme im Laufe der vorliegenden Untersuchungen geändert haben, läßt sich folgendermaßen abschätzen: Legt man eine mittlere spontane Mutationsrate von ca. 10^{-8} Mutationen pro Generation, Zelle und Gen zugrunde und berücksichtigt, daß die Stämme im Laufe der hier vorliegenden Untersuchungen ca. 5 mal neu übertragen wurden und bei jeder Übertragung jede übertragende Zelle ca. 6 Generationen durchläuft, so ist die Wahrscheinlichkeit für eine Zelle an einem beliebigen Gen mutiert zu sein ca. $3 \cdot 10^{-7}$. Schätzt man die Zahl der mutablen Gene im haploiden Chromosomensatz von Saccharomyces mit einer Zehnerpotenz höher als bei Escherichia coli (siehe hierzu z.B. KAUDEWITZ u. Mitar. 1963), also mit 10^5 ab, so ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit, daß eine Zelle überhaupt mutiert ein Wert von ca. $3 \cdot 10^{-2}$. Rund jede 30ste Zelle kann also in den jetzt vorliegenden Stammkulturen mutiert sein. Dies würde nur eine kleine Heterogenität und Abweichung von der Homozygotie und Isogenie bedeuten, wenn sicher wäre, daß keine der aufgetretenen Mutanten einen Selektionsvorteil besitzt; über Selektionsmechanismen ist jedoch nichts bekannt.

Gruppe der Experimente	Verwendeter Stamm	Ploidiegrad	Genotyp bzw. in () Phänotyp[1]		Weitgehende Isogenie u. Homozygotie zu[2]
Spontane Mutabilität	211-1aM	1	(iv)	α	
	211-1aM/2	2	(iv)	αα	211-1aM
	230	2	(iv)	αa	"
	301	3	(iv)	ααa	"
	401	4	(iv)	αααa	"
Röntgenstrahleninduzierte Mutabilität und Inaktivierung.	211-1aM	1	(iv)	α	
	211-1aM/2	2	(iv)	αα	211-1aM
	230-1c/2	2	(iv)	aa	"
	230	2	(iv)	αa	"
	401-51d	2	(iv)	αa	"
	410-12a	2	(iv, se)	αa	"
	410-6d	2	(iv, se)	αa	"
	301	3	(iv)	ααa	"
	401	4	(iv)	αααa	"
	211-1bN	1	(se)	a	"
	211-1bN/2	2	(se)	aa	211-1bN
	400-53d	2	(se)	αa	"
	219	2	(se)	αa	"
	300	3	(se)	αaa	"
	400	4	(se)	ααaa	"
	R-154[3]	1	ad_2,hi_1,ur_1	α	
	R-154a	1	hi_1,ur_1	α	R-154
	R-154/2	2	ad_2,ad_2, hi_1,hi_1, ur_1,ur_1	αa	"
UV-induzierte Mutabilität	211-1a/2	2	(IV)	αα	
	211-1aM	1	(iv)	α	
	211-1aM/2	2	(iv)	αα	211-1aM
	230	2	(iv)	αa	"
	301	3	(iv)	ααa	"
	401	4	(iv)	αααa	"

Tab. 1 1. Teil

Fortsetzung Tab. 1

Gruppe der Experimente	Verwendeter Stamm	Ploidiegrad	Genotyp bzw. in () Phänotyp[1]		Weitgehende Isogenie u. Homozygotie zu[2]
Mutationsraten für rezessiv letal wirkende Gene	A 106	1	ur_3,hi_2,le_1, ar_4,ly_1,me_2	a	-
	A 103	1	ad_1,ly_2,tr_1, hi_4	α	-
	H 168[4]	2	ad_1,Ad_1,ly_2,Ly_2, hi_4,Hi_4,tr_1,Tr_1, ur_3,Ur_3,hi_2,Hi_2, le_1,Le_1,ar_4,Ar_4, ly_1,Ly_1,me_2,Me_2	αa	(Durch Kreuzung von A 103 X A 106 entstanden)
	211-1aM	1	(iv)	α	
	211-1bN	1	(se)	a	
	2T1	2	(iv IV se Se)	αa	(Durch Kreuzung von 211-1aM u. 211-1bN entstanden)
"Mitotisches crossover"	H 168	2	siehe oben		
Teilungsstammbäume	A 103	1	siehe oben	α	nicht isogen und homozygot
	H 168	2	siehe oben	αa	
	400	4	(se)	αααa	

Tab. 1 Übersicht über die in den verschiedenen Gruppen von Experimenten verwendeten Stämme.

1) α und a sind die Paarungstypallele; kleine Buchstaben bedeuten im hemi- oder homozygoten Zustand Bedürftigkeit für den betreffenden Stoff.

2) Siehe dazu die Vorbehalte im Text.

3) R-154 ist mit dem in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 benutzten Stamm 270-4d identisch.

4) Inwieweit der Stamm wirklich für hi_2 und hi_4 heterozygot ist, ist nicht restlos geklärt, siehe dazu 3.3.1.

Im Stamm 219 konnte Anfang 1964 eine Heterozygotie für ad_1 oder ad_2 festgestellt werden. Da der Stamm außerdem stets sehr viele Serin-prototrophe Spontanmutanten ergab, wurde er nicht weiter verwendet. An seine Stelle trat ein Segregant des Stammes 400 (400-53d), der ebenfalls αa und (se) war.
Die Stämme 410-12a, 410-6d sind diploide Segreganten eines tetraploiden Stammes, der durch Kreuzung von 211-1aM/2 u. 211-1bN/2 entstanden ist. Der Stamm 401-51b ist ein diploider Segregant des Stammes 401.
Da sich während der über 3 Jahre laufenden Mutationsexperimente keine systematische Verschiebung der Mutationsraten ergab, scheinen in den homozygoten und isogenen Stammsystemen keine für diese Experimente wichtigen Populationsumschichtungen stattgefunden zu haben, deshalb soll im folgenden von "fast homozygoten und isogenen Stämmen" gesprochen werden, womit angedeutet sei, daß auf die vorliegenden Stämme die Bezeichnung "weitestgehend homozygot und isogen" nicht mehr zuzutreffen braucht.
Stamm R 154/2 ist aus dem Stamm R 154 als Diplont mittels des Mikromanipulators isoliert worden. Er erwies sich als gleich auxotroph wie R 154, sporulierte, gab für die Paarungstypallele eine 2 : 2 Aufspaltung und zeigte die Strahlenempfindlichkeit für UV und Röntgenstrahlen, wie sie bei einem Diploiden zu erwarten ist, er ist also diploid. -
R 154a wurde als weiße und für Adenin prototrophe Mutante aus R 154 als Kolonie isoliert.
Die Stämme A 103, A 106 und H 168 wurden von OESER aufgebaut[1]. Zur Kartierung der Markierungsgene im Stamm H 168 siehe 3.3.1.

2.2. Nährmedien

Für die verschiedenen Versuche wurden Standardmedien benutzt, die im folgenden nur noch durch ihre Kurzbezeichnung gekenn-

---

1) Herrn Dr. OESER sei an dieser Stelle für die Überlassung dieser Stämme herzlich gedankt.

zeichnet werden sollen. Dabei bezeichnet ein Minus-Zeichen und eine Buchstabenkombination[1] hinter dem Kurzzeichen für das Standardmedium ein Medium, welches wie das betreffende Standardmedium aufgebaut ist, dem aber die durch die Buchstabenkombination gekennzeichnete(n) Substanz(en) fehlt (fehlen), ein solches Medium wird im folgenden Mangelmedium genannt.

Feste Standardmedien

a) Hefe-Extrakt-Medium (YP): 2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt (Difco), 1/2 % Pepton aus Fleisch (Merck), 2 % Agar.

b) Synthetisches Vollmedium nach WICKERHAM (W): Rezept siehe LASKOWSKI 1960, zusätzlich wurden noch 100 mg Serin, 100 mg Isoleucin und 100 mg Valin pro Liter zugegeben.

c) Angereichertes synthetisches Vollmedium (H): Rezept siehe LASKOWSKI 1960, zusätzlich wurden noch 100 mg Argenin, 100 mg Threonin, 100 mg Lysin und 100 mg Leucin pro Liter zugegeben.

Flüssige Standardmedien

a) Hefeextrakt-Medium (YPf): Wie YP, aber ohne Agar.

b) Synthetisches Vollmedium (Wf): Wie W ohne Agar.

Puffer (P)

Zu allen Verdünnungen wurde ein m/20 KH_2PO_4-Puffer benutzt. Bezüglich der Sporulationsmedien siehe 2.6.

Das YP-Medium für die Vorkulturen wurde unmittelbar vor seiner Verwendung gekocht. Sonst war das benutzte YP-Medium 2 Tage alt. Das W-Medium für die Mutationsexperimente war stets einen Tag alt. H-Medium für quantitative Experimente war niemals älter als 3 Tage, für Stempelteste bis zu 8 Tage alt. - Zwischen Kochung und Verwendung wurden die festen Medien bei 25° - 30°C aufgehoben. Die flüssigen Medien wurden bis zu 14 Tage im Eisschrank aufbewahrt.

---

1) Se = Serin, IV = Isoleucin + Valin. Sonstige Abkürzungen für Aminosäuren und Nucleinsäurebasen wie für die Markerbezeichnung bei Saccharomyces in Microbial Gen. Bull. Suppl. 19, 1963 angegeben.

2.3. Durchführung und Auswertung der Mutationsexperimente

Bei den Mutationsexperimenten wurden die Mutationsraten im allgemeinen aus der Zahl der nach ca. 7 Tagen nach der Beimpfung auf einem Medium, welches dem Ausgangsstamm kein Wachstum ermöglichte, aufgewachsenen Kolonien unter Berücksichtigung weiterer Meßwerte ermittelt. Als prototrophe Kolonien galten dabei alle mit dem bloßen Auge auf dem Mangelmedium gut erkennbaren Kolonien ($\varnothing \gtrsim 0{,}2$ mm). Die Zeit von ca. 7 Tagen wurde gewählt, da eine normale prototrophe Zelle innerhalb dieses Zeitraums bei der stets benutzten Bebrütungstemperatur von 30°C zu einer gut sichtbaren Kolonie aufwächst.

2.3.1. Zur Problematik des "Rückmutations"-Testes

Alle im folgenden angegebenen Mutationsraten, bis auf die für rezessiv letal wirkende Gene, wurden mittels des sogenannten "Rückmutations"-Testes ermittelt, bei dem durch Ausplatten auf einem Mangelmedium geprüft wird, wieviel prototrophe Mutanten in einer sonst auxotrophen Population vorhanden sind. Bei diesem Verfahren wird also nur der Phänotyp, aber nicht der Genotyp der Mutanten getestet. Wie bereits früher ausführlich dargelegt (HAEFNER 1961), sind diese Mutanten im allgemeinen nicht "Rückmutanten" in dem Sinne, daß die bei dem auxotrophen Stamm aufgetretene genetische Veränderung durch echte Reparation des Trägers der entsprechenden Information (DNS) aufgehoben wird. Es handelt sich vielmehr bei den "Rückmutanten" im allgemeinen um phänotypisch prototrophe Zellen, in denen die zur Prototrophie nötigen Synthesen auf Umwegen laufen (Vorwärtsmutation anderer (Suppressor-)Gene), oder in denen eine weitere Veränderung im ausgefallenen Operon eine fast normale Synthese des benötigten Stoffwechselproduktes ermöglicht.

Interessiert man sich für die Wechselwirkung von mutagenen Agenzien mit spezifischen und klar abgegrenzten Gen-Bereichen, so ist der einfache "Rückmutations"-Test unbrauchbar.

In der vorliegenden Arbeit interessierte jedoch weniger die spezifische an einem bestimmten Gen gesetzte Mutation, sondern die Abhängigkeit der Summe aller zum prototrophen Phänotyp führenden Mutationen vom Ploidiegrad. Bei dominantem Charakter der "Rückmutation" und kleinen Mutationsraten sollte man dabei eine der Vervielfachung des Chromosomensatzes angenähert proportionale Zunahme der Mutationsraten erwarten.
Im folgenden soll das Wort "Rückmutation" unter Berücksichtigung der eben diskutierten Vorbehalte für die funktionelle Wiederherstellung des prototrophen Phänotyps benutzt werden, ohne daß damit etwas über den Charakter der "Rückmutanten" gesagt ist.

2.3.2. Bestimmung der spontanen Mutationsraten

Die spontanen Mutationsraten wurden mittels des von LURIA und DELBRÜCK 1943 angegebenen Fluktuationstestes ermittelt. Dazu wurde von dem betreffenden Stamm eine Präkultur in YPf angezogen, diese auf Spontanmutanten geprüft und in den Fällen, in denen weniger als 10^{-7} Mutanten/Zellen vorhanden waren, für mehrere Fluktuationsteste benutzt. - Aus der im Eisschrank aufbewahrten Präkultur wurde vor jedem Versuch eine Verdünnung auf ca. 10^3 Zellen/0,1 ml hergestellt und mit je 0,1 ml ca. 30 Reagenzgläser mit jeweils 5 cm^3 YPf beimpft. Durch Bebrütung bei 30°C ergab sich ein in Vorversuchen ermittelter Endtiter, der gewährleistete, daß nicht in allen Röhrchen Mutanten während des Aufwachsens entstanden (siehe dazu die rechnerischen Betrachtungen unten). Die Bebrütungszeit lag im Mittel bei 30 std, die Endzellmenge bei 10^8 Zellen/Röhrchen.
Nach Beendigung der Bebrütung wurden die 5 cm^3 YPf in Zentrifugengläser überführt, die Zellen zweimal mit P gewaschen und in ca. 0,2 ml P auf jeweils eine Platte mit W-Se-IV-Medium plattiert. Jeweils der Zellinhalt von 3 Zentrifugengläsern wurde in 5 cm^3 P aufgenommen, und der Titer dieser Suspensionen in der Zählkammer bestimmt. Aus diesen

Zelltitern und dem bekannten Volumen ergab sich die mittlere Endzellmenge. Die Endzellmengen schwankten in den einzelnen Gläsern um ca. 20 % gegenüber der mittleren Endzellmenge. - Die Zelltiterbestimmung wurde beim haploiden Stamm durch starke Verklumpung (typische Verteilung z.B.: 80 Einzel-, 96 Doppel-, 45 Dreier-, 76 Viererzellen und 166 Zellkomplexe mit mehr als 4 Zellen) erschwert. Da aber große und unübersichtliche Zellklumpen mit mehr als 10 Zellen selten waren (< 1%), erscheint die mikroskopische Zählung zuverlässig.
Restteilungen der auxotrophen Zellen traten nicht auf (siehe 2.3.3.2.).
Die Ermittlung der spontanen Mutationsrate erfolgte nach zwei verschiedenen rechnerischen Verfahren: Zum einen aus dem Anteil der von spontanen Mutanten freien Platten (p_o-Methode) und zum anderen aus der im Mittel über alle Platten pro Platte vorhandenen Zahl von Mutanten.

1. p_o-Methode: Nimmt man mit LURIA und DELBRÜCK 1943 an, daß das Auftreten von Mutationen in den Röhrchen mit YPf einer Poisson-Verteilung gehorcht, so ist die Wahrscheinlichkeit keine Mutante und also auch keine Mutation in einem Röhrchen bzw. auf der entsprechenden Platte zu finden

$$(2) \qquad p_o = e^{-m} ,$$

wenn m die mittlere Zahl der aufgetretenen Mutationen pro Röhrchen ist. Für die spontane Mutationsrate (a) ergibt sich daraus nach NEWCOMBE 1948:

$$(3) \qquad a = - \frac{\ln 2 \ln p_o}{N - N_o} \left[\frac{\text{Mutanten}}{\text{Zelle} \cdot \text{Generation}} \right] .$$

Dabei ist N die Endzellmenge pro Röhrchen und N_o die Menge

der eingeimpften Zellen pro Röhrchen. Da hier $N \gg N_0$ ist, kann man schreiben

$$(4) \qquad a = -\frac{\ln 2 \ln p_0}{N} \left[\frac{\text{Mutanten}}{\text{Zelle} \cdot \text{Generation}}\right].$$

Der Fehler für die Bestimmung von a nach (4) erreicht nach LEA und COULSON 1949 ein Minimum für $m \approx 1{,}5$, also $p_0 \approx 0{,}22$. Es wurde in allen Versuchen darauf geachtet, daß das durch die Bebrütungszeit einstellbare N so gewählt war, daß p_0 bei 0,20 lag.

2. r-Methode: Die p_0-Methode nutzt die in dem experimentellen Material steckende Information nur teilweise aus, da die Zahl der aufwachsenden Mutanten unberücksichtigt bleibt. Diese Information wird mitbenutzt bei der von NEWCOMBE 1948 angegebenen r-Methode (siehe dort Seite 452). Bei dieser Methode wird die Mutationsrate a aus der mittleren Zahl von Mutanten/Platte unter Zugrundelegung einer geeigneten Verteilung der Mutanten (nicht Mutationen) errechnet. Wichtige Voraussetzung für diese Methode ist, daß sich aus jeder während des Aufwachsens entstehenden Mutante jeweils eine Kolonie bildet. Diese Voraussetzung ist jedoch bei dem hier vorliegenden Material nur bedingt erfüllt, da die sprossenden Saccharomyces-Zellen gerade in der exponentiellen Wachstumsphase zusammenbleiben. Dennoch wurde das r-Verfahren auf das Material angewandt, da dieser störende Einfluß für kleine m-Werte nicht zum Tragen kommen sollte.

Die rechnerische Bestimmung von a erfolgte nach NEWCOMBE 1948 aus der Gleichung

$$(5) \qquad r = \frac{aN}{\ln 2} \ln\left(\frac{CaN}{\ln 2}\right),$$

wobei r die mittlere Zahl der Mutanten/Platte, gemittelt über alle Platten und C die Zahl der ausgewerteten Platten ist; außerdem ist wieder vorausgesetzt $N \gg N_0$. Die Auswertung erfolgte über eine graphische Darstellung der Funktionsschar $r = b \ln Cb$ mit C als Parameter. Der zu einem r-Wert gehörige Wert von b wurde auf der Kurve für das betreffende C abgelesen, daraus ergab sich die spontane Mutationsrate zu

$$(6) \qquad a = \frac{b \ln 2}{N} \left[\frac{\text{Mutanten}}{\text{Zelle} \cdot \text{Generation}} \right].$$

2.3.3. Bestimmung der strahleninduzierten "Rückmutations"-Raten Die experimentelle Durchführung der Versuche, in denen die Mutationsraten für die Mutationen von der Auxotrophie zur Prototrophie ermittelt wurden, entsprach im allgemeinen der in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 beschriebenen Versuchsdurchführung, Abweichungen traten in folgenden Punkten auf:

a) Vorkultur: Die Vorkulturen wurden auf YP-Medium angezogen. Am ersten Tag erfolgte die Beimpfung von ca. 15 Platten je Stamm mit jeweils ca. 10^6 Zellen. Diese wuchsen innerhalb von ca. 3 Tagen bei 30°C zu einem Rasen auf, der am 7. Tag mit ca. 0,2 ml P mittels eines Glasspatels aufgeschwemmt und neu verteilt wurde. Mit dem zum Verschmieren der Zellen auf einer Platte benutzten Spatel wurde dann auf jeweils einer halben Platte mit Mangelmedium ein dichter Zellausstrich angelegt. Diese Testausstriche wurden ebenfalls bei 30°C bebrütet. Am 13. bzw. 14. Tag, dem Tag des Experimentes, wurden alle Präkulturen gründlich auf Verunreinigungen und die Testausstriche auf prototrophe Mutanten durchgesehen. Für das Experiment kamen nur solche Präkulturen zur Verwendung, deren Testausstriche höchstens 5 Mutanten aufwiesen. Die Zellen wurden von dem YP-Medium

mit 5 cm^3 P abgeschwemmt und nach zweimaligem Waschen im allgemeinen fraktioniert zentrifugiert, da der primäre Anteil von Nichteinzelzellen bei einigen Stämmen recht hoch war. Nach dem fraktionierten Zentrifugieren betrug der Anteil der Nicht-Einzelzellen stets ≤ 10 %, wobei ca. 90 % der Nicht-Einzelzellen Doppelzellen waren.

b) Auszählen der Kolonien: Die aufgewachsenen Kolonien wurden - wie bereits unter 2.3. beschrieben - im allgemeinen 7 Tage nach dem Versuch ausgezählt. Eine zweite Zählung der Mutantenkolonien nach 14 Tagen ergab einen von Stamm und induzierender Strahlenart abhängigen, mehr oder minder großen Zuwachs von Mutanten, während auf den Platten, auf denen die Überlebenden bzw. die den Zelltiter repräsentierenden Zellen aufwuchsen keine über 5 % hinausgehende Erhöhung der Koloniezahl nach der ersten Zählung zu beobachten war.

2.3.3.1. Rechnerischer Ansatz

Die "Rückmutations"-Raten (m(D)) wurden wie in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 nach der Gleichung:

$$(7) \qquad m(D) = \frac{N(D) - \ddot{u}'(D)\, p' - \ddot{u}'(D)\, a'\, m_{sp} t}{a'\, \ddot{u}'(D)}$$

ermittelt, wobei N(D) die bei einer Dosis D im Mittel über ca. 10 Platten pro Platte aufgewachsene Zahl von prototrophen Mutanten, ü'(D) die Überlebenswahrscheinlichkeit des Zellgruppengemischs, a' die Zahl der pro Platte inokulierten Zellgruppen (Einer + Zweier + Dreier + ...), p' die Zahl der auf Kontrollplatten, die mit der gleichen Zahl von Zellgruppen beimpft wurden, aufgewachsenen spontanen Mutanten und m_{sp} die spontane Mutationsrate in dem Fall ist, daß die Zellen auf dem Mangelmedium ruhen und t die Zeit angibt, in der noch spontan Mutanten entstehen können, die nach 7 Tagen mitgezählt werden.

Da m_{sp} für einige Stämme in der Größenordnung von m(D) lag, mußte das letzte Glied auf dem Bruchstrich für diese Stämme mitberücksichtigt werden.
Die Anwendung der Gleichung (7) erfordert, wie ebenda gezeigt, die Erfüllung einer Reihe von Voraussetzungen, die - wie im nächsten Abschnitt behandelt wird - alle erfüllt sind.
Neben diesen Bedingungen sei hier noch kurz auf ein weiteres Problem bei der Bestimmung von "Rückmutations"-Raten eingegangen. Wie vor allem aus den Arbeiten mit Escherichia coli (siehe z.B. WITKIN 1956 u. 1958, KADA, BRUN u. MARCOVICH 1960, HILL u. SIMSON 1960), aber auch bei Saccharomyces (LASKOWSKI u. SCHÄDEL 1964, PATRICK, HAYNES, URETZ 1964) bekannt, können Überlebenswahrscheinlichkeit und Mutationsraten vom Medium abhängen, auf das die bestrahlten Zellen aufgebracht werden. Da aber beim "Rückmutations"-Test die Mutanten auf einem Medium aufwachsen, welches um einen (oder wenige) Stoff(e) ärmer ist als das Medium, auf dem die Überlebenswahrscheinlichkeit bestimmt wird, ist es a priori nicht ausgeschlossen, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit der "werdenden Mutanten" eine andere ist als die der auxotrophen Zellen.
Ein genaues Verfahren zu prüfen, inwieweit dies der Fall ist, besteht darin, nach der Bestrahlung auf dem Vollmedium, welches dem auxotrophen Stamm das Wachstum ermöglicht, zahlreiche Zellen auszuplatten, diese, nachdem sie zu Kolonien aufgewachsen sind, auf das Mangelmedium zu überstempeln und dann aus der Zahl der prototrophen Kolonien die Mutationsrate zu ermitteln.
Dieses sehr mühsame Verfahren konnte wegen der maximal ca. 10^{-4} Mutanten pro Überlebende betragenen Mutationsraten und dem damit verbundenen Aufwand nicht angewandt werden. Es wurden jedoch in einigen Fällen zwischen UV- bzw. Rö-Bestrahlung und Ausplattung Bebrütungen der "werdenden Mutanten" in YPf über längere Zeit durchgeführt (siehe 3.1.3.3.), die keine signifikante Verschiebung der Muta-

tionsraten und damit keinen Hinweis auf eine in der ersten Zeit nach der Bestrahlung bestehende Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit vom Medium geben.

2.3.3.2. Überprüfung der Voraussetzungen

Entsprechend den in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 gemachten Voraussetzungen für Gleichung (7) wurden folgende Fragen geprüft:

a) Gibt es Restteilungen der Überlebenden auf Mangelmedium?

Bringt man Saccharomyces-Zellen der benutzten IV- bzw. Se-bedürftigen Stammserien aus einer 24 Stunden alten Präkultur in YPf (geschüttelt) auf ein Mangelmedium und zählt mikroskopisch in einem abgegrenzten Gebiet die Häufigkeit der Einzelzellen, Zweier-, Dreier- usw. -Gruppen unmittelbar nach der Beimpfung, am nächsten und übernächsten Tag aus, so ergeben sich für die IV-bedürftigen Stämme die Werte der Tab. 2. Man erkennt, daß keinerlei Verschiebungen der Gruppenhäufigkeit, also keine Restteilungen auftreten. Gleiche Ergebnisse wurden für die Se-bedürftigen Stämme erhalten. - Bezüglich der Restteilungen des Stammes R 154 (identisch mit 270-4d) siehe HAEFNER u. LASKOWSKI 1963.

Da selbst Zellen dieser Stämme aus frischen YPf-Vorkulturen nicht in der Lage sind, auf Mangelmedium Restteilungen zu machen, erscheint es gesichert, daß die bestrahlten und physiologisch wesentlich "ärmeren" Zellen aus den 14 Tage alten Präkulturen ebenfalls keine Restteilungen machen können.

b) Werden neu entstandene prototrophe Mutanten durch die sie im Überschuß umgebenden auxotrophen Zellen am Aufwachsen behindert? Wie in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 wurde 1. geprüft, inwieweit durch eine Verdünnung des Bestrahlungsgutes im Verhältnis 1 : 10 nach der Bestrahlung eine Veränderung der strahleninduzierten Mutationsraten auftritt; innerhalb der Fehlergrenzen erwiesen sich die Mutationsraten als von der Konzentration der auxotrophen Zellen auf

Stamm	Zeit	Einzel-zellen	Doppel-zellen	Dreier-Gruppen	Vierer-Gruppen	Gruppen Vierer
211-1aM (hapl)	1. Tag	118 (55)	75 (35)	12 (6)	4 (2)	5 (2)
	2. Tag	227 (52)	160 (37)	27 (6)	14 (3)	7 (2)
	3.Tag	335 (58)	194 (34)	23 (4)	15 (3)	5 (1)
230 (dipl.)	1. Tag	188 (41)	267 (58)	7 (1)	0	0
	3. Tag	178 (40)	259 (58)	8 (2)	1 (0)	0
401 (tetrapl.)	1. Tag	124 (44)	146 (52)	9 (3)	4 (1)	0
	3. Tag	137 (40)	193 (56)	6 (2)	6 (2)	0

Tab. 2 Überprüfung der Fähigkeit zu Restteilungen bei IV-bedürftigen Saccharomyces-Stämmen unterschiedlichen Ploidiegrades auf einem W-IV-Se-Medium. In () prozentualer Anteil der betreffenden Zellgruppe an allen Zellgruppen.

dem Mangelmedium unabhängig. Ferner wurde 2. untersucht, ob in einer Mischung von prototrophen Mutanten (ca. 200 pro Platte) und auxotrophen Zellen (geprüft für Konzentrationen zwischen 10^7 und 10^9 Zellen pro Platte) alle prototrophen Zellen aufwachsen. Es zeigte sich, daß in den Grenzen der hier benutzten Titer 100 % der prototrophen Zellen zu Kolonien aufwuchsen.

Während die Überprüfung nach 1. sowohl für die Se- wie für die IV-bedürftigen Stämme erfolgte, wurden nach 2. nur die Ploidieklassen p = 1, 2 und 4 der IV-bedürftigen Stämme überprüft. - Bezüglich des Stammes R 154 siehe wieder HAEFNER u. LASKOWSKI 1963.

Für das vorliegende Material gibt es also keinen störenden "GRIGG-Effekt"(GRIGG 1952), alle prototrophen Mutanten können auch in Gegenwart von ca. 10^9 auxotrophen Zellen/Platte aufwachsen, was wesentlich über den meist benutzten Konzentrationen von $5 \cdot 10^7$ Zellen/Platte liegt.

c) Kommt es zu einer Selektion prototropher, bereits vor der Bestrahlung vorhandener Mutanten? Während für Haplonten nach UV und Röntgenstrahlen und für Di- und Polyplonten nach UV kein Einfluß von bestimmte Auxotrophien bedingenden Gene auf die Inaktivierung von Saccharomyces gefunden wurde, unterscheiden sich die Rö-Inaktivierungskurven für die hier benutzten IV- und Se-auxotrophen Di- und Polyplonten von denen der zugehörigen prototrophen Stämme (LASKOWSKI 1962a, AS-Effekt). Wie in 3.1.2.1. gezeigt wird, sind diese Unterschiede jedoch auf synthetischem Vollmedium gering, bei den IV-bedürftigen Diplonten sind die prototrophen Stämme etwas weniger empfindlich als die auxotrophen. Prinzipiell ist also eine, wenn auch negative Selektion der prototrophen Spontanmutanten möglich.
Um eine sehr aufwendige genaue Analyse der Strahlenempfindlichkeit verschiedener "Rückmutanten" für die zahlreichen untersuchten Stämme nach UV- und Röntgenbestrahlung zu vermeiden, wurden für die Ermittlung der Mutationsraten alle die Werte verworfen, in denen die Zahl der im Inokulat vorhandenen Mutanten/Platte (K) und die Zahl der pro Platte nach Applikation einer beliebigen Dosis D ausgezählten Mutanten N(D) nicht der Beziehung

$$N(D) < 0{,}2\ K \quad \text{(für alle D)} \tag{8}$$

gehorchen. Dadurch wurde der Einfluß einer eventuellen Selektion von spontanen Mutanten in den Bereich der Fehlergrenzen herabgedrückt.

d) Werden "entstehende Mutanten" wie auxotrophe oder wie prototrophe Zellen inaktiviert? Nachdem sich gezeigt hat, daß nach Röntgenstrahlen auxotrophe und prototrophe Zellen unterschiedlich inaktiviert werden können, und nachdem es wahrscheinlich ist, daß die Entscheidung "vital" oder "inaktiv" möglicherweise erst nach einigen Teilungen fällt (siehe 3.4.3.), ist es nicht sicher, inwieweit der für Gleichung (7) in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 gemachte Ansatz, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit der "werdenden Mutanten" und der auxotrophen Zellen gleich ist, noch Gültigkeit besitzt. Eine experimentelle Klärung dieses komplizierten Problems kann hier nicht vorgelegt werden. Eine Rechtfertigung, den Ansatz dennoch für die Ermittlung der Mutationsraten zu benutzen, wird darin gesehen, daß alle bisher auf dem synthetischen Vollmedium ermittelten Unterschiede für die Überlebenswahrscheinlichkeit der auxotrophen und prototrophen Zellen kleine Dosisreduktionsfaktoren besitzen und damit zumindest bei kleinen und mittleren Dosen keinen merklichen Einfluß ausüben. Inwieweit die bei einigen Stämmen beobachtete Sättigung der Mutationsraten-Dosis-Kurven bei hohen Dosen durch diesen Effekt bedingt wird, bleibt noch zu klären.

2.3.3.3. Durchführung der Nachbehandlungsexperimente

Während normalerweise die Suspensionen hohen Titers sofort nach der Bestrahlung auf das betreffende Mangelmedium plattiert wurden, erfolgte in einigen Experimenten eine Nachbehandlung in folgender Weise:

a) Photoreaktivierungs- bzw. Photoreversionsexperimente: Die UV-bestrahlten Suspensionen wurden in 5 cm hohe Röhrchen mit einem Durchmesser von 2 cm überführt, nachdem vorher ein Teil auf Mangelmedium ausgeplattet worden war. Diese Röhrchen wurden in einem Wasserbad derart befestigt, daß es möglich war, ihren Inhalt sowohl auf konstanter Temperatur, im allgemeinen 25°C, zu halten als auch gleichzeitig magnetisch zu rühren. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 500 W

Glühlampe, deren Außenwand auf dem Rand des Röhrchens auflag. - Nach der Beendigung der Bestrahlung mit langwelligem Licht wurde die Suspension normal weiterbehandelt.

b) Zwischenbebrütungsexperimente: Bei den Experimenten, in denen geprüft werden sollte, welchen Einfluß eine Bebrütung in YPf nach der Bestrahlung auf Mutationsraten und Überlebenswahrscheinlichkeit hat, wurden die Suspensionen nach der Bestrahlung und dem Ausplatten einer unbehandelten Kontrolle mit doppelt konzentriertem YPf 1 : 1 gemischt und bei 30°C in Zentrifugengläsern im Brutschrank bebrütet. Nach der betreffenden Zwischenbebrütungszeit wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal gewaschen, auf den ursprünglichen Titer wieder eingestellt und normal weiterbearbeitet.

2.3.4. Bestimmung von Mutationsraten für rezessiv letal wirkende Genzustände

Neben der Bestimmung von Mutationsraten für Mutationen von der Auxotrophie zur Prototrophie wurde versucht, Information über die Ploidiegradabhängigkeit der Mutationsraten für rezessiv letal wirkende Gene zu sammeln. Dazu wurden zum einen diploide Zellen bestrahlt, ausgeplattet, die überlebenden Kolonien abgeimpft, zur Sporulation gebracht und geprüft, wie viele letale Sporen jeweils in einer größeren Zahl von Asci einer Abimpfung vorhanden sind. Zum anderen wurden ein oder zwei Haplonten mit der gleichen Dosis bestrahlt, mit einem unbestrahlten Haplont oder miteinander zur Kopulation gebracht und anschließend in gleicher Weise wie die direkt bestrahlten Diplonten untersucht.

2.3.4.1. Rechnerischer Ansatz

Nimmt man mit STEIN u. LASKOWSKI 1958 u. 1960 an, daß die Inaktivierung haploider Saccharomyces-Stämme hauptsächlich durch rezessive Letalmutationen[1)] bedingt ist, so müßten bei den Tetradenanalysen einzelner aus jeweils einer be-

1) Im Sinne von STEIN u. LASKOWSKI wird hier unter einer rezessiven Letalmutation die Mutation eines Gens, welches im hemi- oder homozygoten Zustand zur Inaktivierung der betreffenden Zelle führt, verstanden.

strahlten Einzelzelle bzw. Zygote stammenden Diplonten letale Sporen und eine normale Segregation für die rezessiv letal wirkenden Gene auftreten. Unter dieser Voraussetzung wäre es im Prinzip möglich, aus der Aufspaltung von vitalen : letalen Sporen (v : l) zu bestimmen, wieviel Kopplungsgruppen vorhanden sind, in denen rezessiv letal wirkende Gene auftreten, und wie hoch eine über alle diese Gene gemittelte Mutationsrate für die Auslösung derartiger rezessiv letal wirkender Genzustände ist. Es zeigt sich jedoch, daß die Ermittlung der Zahl der in einem untersuchten Diplonten segregierenden rezessiv letal wirkende Gene nur selten möglich ist, da in den Tetradenanalysen neben den zu erwartenden v:l-Verhältnissen von z.B. 4:0 oder 2:2 sowie 2:2, 1:3 und 0:4 häufig auch bei der Segregation eines Diplonten unerwartete v:l-Verhältnisse von z.B. 4:0, 3:1, 2:2 auftreten (siehe dazu 3.2.1.). Damit verbietet das experimentelle Material eine Rechnung unter der einfachen Annahme, daß die Inaktivierung von haploiden Zellen bzw. Sporen durch rezessiv-letale Effekte auf die Wirkung von jeweils allein inaktivierenden Genen zurückgeht und fordert ein komplizierteres Modell, welches auch eine polygene Inaktivierung durch mehrere, jeweils allein nicht inaktivierend wirkende Gene mitberücksichtigt[1].

Ein derartiges Modell, welches für seine Orientierung ausreichend experimentelles Material benötigt, soll und kann hier nicht gegeben werden. Es soll hier nur eine Abschätzung gemacht werden, die es erlaubt festzustellen, wie groß die Rate mit der insgesamt pro Chromosomensatz rezessiv letal wirkende Zustände auftreten, ist.

Wenn r die mittlere Mutationswahrscheinlichkeit für das Auftreten einer rezessiven Letalmutation bzw. einer rezessiv letal wirkenden Genkombination ist und n die Zahl der betreffenden Loci bzw. Loci-Kombinationen, dann ist die

---

1) Daneben bleibt alternativ die Annahme, daß die anomalen v:l-Verhältnisse durch kleine Expressivität der rezessiv letal wirkende Gene bedingt sind.

Wahrscheinlichkeit, daß alle Sporen in allen Tetraden eines Stammes vital sind, der aus der Kreuzung eines bestrahlten und eines möglichst fast homozygoten und isogenen unbestrahlten Haplonten entstanden ist:

$$(9) \qquad M_1 = (1 - r)^n$$

Wird ein mit den Haplonten möglichst isogener und homozygoter Diplont bestrahlt, so ist die Wahrscheinlichkeit, einen Stamm ohne letale Sporen zu finden:

$$(10) \qquad M_2 = \left[(1 - r)^n\right]^2 \bar{W} \quad .$$

$\bar{W}$ (< 1) ist ein Wechselwirkungsglied, welches berücksichtigt, daß auch dann letale Sporen auftreten können, wenn jeder Chromosomensatz für sich allein frei von rezessiv letal wirkenden Zuständen ist.
Werden beide fast homozygoten und isogenen Haplonten bestrahlt, so sollte in der einfachen Vorstellung die dann zu erwartende Wahrscheinlichkeit für Freiheit von letalen Sporen $M_{11} = M_2$ sein. Für kleine r und $n \leq 30$[1] läßt sich $r \cdot n$, die Rate, mit der insgesamt pro Chromosomensatz rezessiv letal wirkende Zustände auftreten und das Wechselwirkungsglied $\bar{W}$, aus (9) bzw. (10) ermitteln.

---

1) Bei bisher 15 bekannten Chromosomen von Saccharomyces und unter der Annahme einer Gleichverteilung der rezessiven Letalfaktoren kann man die Zahl der Kopplungsgruppen mit maximal ca. 30 abschätzen.

2.3.4.2. Durchführung der Experimente

Zur Ermittlung von rezessiv letal wirkenden Mutationen in als Haplonten bestrahlten Zellen wurden zwei Methoden angewandt:

a) Massentechnik: Die zu bestrahlenden komplementär auxotrophen Haplonten A 103 und A 106 und der Diplont H 168 wurden 48 Std. in YPf auf einem Schüttler bei 30°C angezogen, zweimal gewaschen, falls nötig, fraktioniert zentrifugiert und bestrahlt. Die Überlebenden wurden auf H-Medium bestimmt. Nach der Bestrahlung wurden die Diplonten sofort auf das gleiche Mangelmedium wie die entsprechenden Haplontenkombinationen plattiert, während die Haplonten erst getrennt für 1,5 Std. in YPf bei 30°C geschüttelt, danach abzentrifugiert und auf YP-Medium gemeinsam in hoher Konzentration ausgestrichen wurden. Auf diesem Medium verblieben sie bei 30°C für ca. 3 Std., bis ein hoher Anteil von Zygoten vorhanden war; nach Abschwemmen und zweimaligem Waschen kam das Gemisch aus Zellen und Zygoten auf das H-Mangelmedium, wo nur die prototrophen Zygoten nach ca. 7 Tagen zu Kolonien aufwuchsen. Diese Kolonien wurden genauso wie die aus den als Diplonten bestrahlten Zellen aufgewachsenen abgeimpft und einer normalen Tetradenanalyse (siehe 2.6.) unterzogen.

b) Individuelle Technik: Die benutzten Stämme (211-1aM, 211-1bN und 2T1) wurden bis nach der Bestrahlung wie unter a) angegeben behandelt. Die Überlebenden ergaben sich durch Plattieren auf YP-Medium. Nach der Bestrahlung wurde der Diplont sofort auf YP-Medium ausgeplattet. Von den Haplonten kamen zur Durchführung der Kopulation jeweils zwei Ausstriche auf eine YP-Mediumschicht. Auf dieser Schicht wurden zu bestimmten Zeiten nach der Bestrahlung mikromanipulatorisch jeweils 2 Haplontenzellen der beiden bestrahlten Stämme zusammengeschoben. Die auf dem Medium aufwachsenden Kolonien wurden abgeimpft und, falls sie diploid waren, zur Sporulation gebracht und einer Tetradenanalyse unterzogen.

Die Kontrolle des Aufwachsens der Sporen zu Kolonien erfolgte mit dem bloßen Auge und mikroskopisch. Als "letale Spore" galten alle Sporen, die entweder überhaupt keine Teilungen durchführten oder höchstens zu einer Mikrokolonie ($\varnothing \leq 0{,}2$ mm) aufwuchsen. Letztere wurden deshalb als letal gewertet, weil Abimpfungen in YP häufig gezeigt hatten, daß solche Mikrokolonien nicht weiterwachsen.

2.4. Untersuchung des "mitotischen crossover"

Um in dem auf 9 Chromosomen heterozygot markierten diploiden Stamm H 168 festzustellen, wie häufig nach Bestrahlung auxotrophe Kolonien auftreten[1], wurde folgendermaßen verfahren: Der Stamm wurde über 10 Tage bei 30°C auf YP-Medium angezogen, abgeschwemmt, zweimal gewaschen, wenn nötig fraktioniert zentrifugiert (Klumpenhäufigkeit <5%) und ein Titer eingestellt, der nach der betreffenden Bestrahlung ca. 100 Kolonien/Platte ergab. Nach der Bestrahlung wurden ca. 100 Petrischalen (mit YP-Medium) beimpft. Die nach 3 Tagen aufgewachsenen Kolonien wurden mit der üblichen Stempeltechnik auf ein H-Medium gestempelt, dem alle die Substanzen fehlten, für die der Stamm H 168 heterozygot Auxotrophien besitzt (H-Mangelmedium). Die Kolonien, deren Stempelabdrücke nicht wuchsen, wurden abgeimpft und jeweils 25 Kulturen auf Petrischalen mit YP-Medium in Form eines Rasters angeordnet. Durch Stempeln dieser Raster auf die Medien H-Ly, H-Hi, H-Me, H-Ad, H-Ar, H-Ur, H-Le und H-Tr und Auswertung der Stempelabdrücke ergab sich, für welchen(e) Stoff(e) die betreffende Kultur bedürftig war. — Bezüglich der Anlage der Teilungsstammbäume für 3.3.2. siehe 2.5. - Während normalerweise in den Teilungsstammbäumen nur kontrolliert wurde, welche Zellen zur Koloniebildung befähigt sind, wurden für die Analyse des Mechanismus des mitotischen crossover alle aufwachsenden Kolonien der

---

1) Inwieweit die auxotrophen Kolonien wirklich durch mitotisches crossover zwischen Centromer und Markierungsgen entstanden sind, wird in 3.3.3. diskutiert.

Teilungsstammbäume in Rasterform auf YP-Medium übertragen und dann auf die oben genannten H-Mangelmedien überstempelt, um ihre spezielle(n) Bedürftigkeit(en) zu klassifizieren.

2.5. Aufnahme der Teilungsstammbäume (TSB)

Vorkultur und Auswahl der Zellen, deren individuelles Schicksal nach der Bestrahlung verfolgt werden sollte, waren für Röntgenstrahlen und UV unterschiedlich (siehe unten). - Die unter dem Mikroskop bei 160-facher Vergrößerung durchgeführte Manipulation der sprossenden Zellen wurde bis auf einige Störungen durch "sich nicht trennen" bei den bestrahlten Zellen stets in folgender Weise ausgeführt: Auf einer 1,5 mm starken, planparallelen, an einem Deckglas hängenden YP-Medium-Schicht lag die "Mutterzelle" des TSB an einer bestimmten Stelle. Das Deckglas (24 x 36 mm) lag in einem Rahmen, dieser auf dem Mikroskop-Objekttisch. Nach der ersten Teilung der Mutterzelle blieb die eine Zelle an der betreffenden Stelle liegen, die andere wurde mittels einer durch einen Mikromanipulator bewegten Nadel auf einen neuen Platz auf der YP-Medium-Oberfläche geschoben. Hatten sich beide Zellen erneut geteilt, so bekam von ihnen jeweils eine Zelle einen neuen Platz. Dieses Verfahren wurde fortgesetzt bis schließlich 32 Zellen in zwei Reihen zu je 16 Zellen auf dem Medium lagen.
Es war nur in Ausnahmefällen möglich, die Mutterzelle auf ihrem Weg zu verfolgen, da die aus Gründen der Orientierung relativ gering gewählte mikroskopische Vergrößerung ein genaues Erkennen der Struktur der Einzelzelle ausschloß.

Die Zeit für das Aufwachsen eines TSB schwankte stark von Zelle zu Zelle und änderte sich mit Stamm- und Strahlenart, lag aber in der Größenordnung von 24 Std. - In einem Versuch wurden im Anfang der Experimente 15, später bis zu 35 Stammbäume zum Aufwachsen gebracht. - TSB, in denen größere Unregelmäßigkeiten durch Nichttrennen der Generationen auftraten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.5.1. Teilungsstammbäume nach UV-Bestrahlung

Alle Stämme wurden auf festem YP-Medium bei 30°C über 10 Tage angezogen. Vor dem Versuch wurden sie abgeschwemmt, zweimal gewaschen, wenn nötig fraktioniert zentrifugiert (Anteil der Doppelzellen $<1\%$), auf einen Titer von ca 10^6 pro 0,1 ml eingestellt, bestrahlt und jeweils ein kleiner Tropfen der bestrahlten Suspension auf den Rand der YP-Medium-Schicht gebracht. Die Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit erfolgte durch Ausplatten geeigneter Verdünnungen der Ausgangssuspension und des Bestrahlungsgutes auf YP-Medium. Ca. 8 Stunden nach der Beimpfung der YP-Schicht wurden die ca. 10^4 Zellen im Tropfen inspeziert und vital aussehende Doppelzellen oder Doppelzellen mit jeweils einer Knospe an den Ort der Mutterzelle gelegt. Dort blieben sie, bis sie sich gut in zwei Gruppen zerlegen ließen, was im allgemeinen im Viererstadium der Fall war. Die beiden Gruppen bestanden dann aus "Mutterzelle" + "zweiter Tochterzelle" und "erster Tochterzelle" + "Enkelzelle". - In den späteren Teilungen gelang es häufig, auch bereits Doppelzellen zu trennen.

2.5.2. Teilungsstammbäume nach Röntgenbestrahlung

Sämtliche Stämme wurden in YPf-Medium über 48 Stunden bei 30°C auf dem Schüttler angezogen, zweimal gewaschen, wenn nötig fraktioniert zentrifugiert (Anteil der Doppelzellen $<1\%$) und bestrahlt. Die Überlebenswahrscheinlichkeit ergab sich durch Ausplatten geeigneter Verdünnungen der Ausgangssuspension und des Bestrahlungsgutes auf YP-Medium. Nach der Bestrahlung wurde wieder auf jede YP-Schicht ein Tropfen des Bestrahlungsgutes übertragen und dann sofort soviel Zellen mikromanipulatorisch herausgezogen, daß im Mittel pro YP-Schicht bei bekannter Überlebenswahrscheinlichkeit 1 - 2 Zellen zu kompletten Stammbäumen aufwuchsen. Die herausgezogenen Zellen wurden laufend mikroskopisch inspeziert, sobald sich eine zu teilen begann, wurde sie auf den Platz der Mutterzelle gezogen und anschließend ver-

sucht, von ihr einen möglichst kompletten TSB zu machen. Begannen mehr als eine der Zellen, sich zu teilen, so war es auf der YP-Schicht möglich, insgesamt 3 TSB mit jeweils 32 Zellen anzulegen. - Zwischen dem Beginn des ersten TSB und dem Beginn des letzten angelegten TSB verstrichen je nach Stamm und Dosis sehr unterschiedliche Zeiten, die in der Größenordnung von 24 Stunden lagen.

2.6. Durchführung aller Tetradenanalysen

Da die Sporulation der in dieser Arbeit häufig benutzten, fast isogenen und homozygoten Saccharomyces-Stämme prinzipiell schlecht ist, mußte nach einem optimalen Sporulationsverfahren gesucht werden. In Abwandlung der von MILLER 1963 u. 1955 beschriebenen Techniken erwies sich folgende Methode als besonders günstig: Am ersten Tag Beimpfung eines Röhrchens mit einer Schrägschicht Präsporulationsmedium (Agar 2 %, Glucose 2 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 %, KH_2PO_4 0,2 %, Yeast-Extract (Difco) 0,5 %), Bebrütung bei 30°C. Am zweiten Tag Abschwemmen des aufgewachsenen Rasens mit 5 ml P, einmaliges Abzentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Aufnehmen in 5 ml flüssigem Sporulationsmedium (K-Azetat 0,83 %, Glucose 0,1 %, Yeast-Extract (Difco) 0,25 %, KCl 0,19 %, $MgSO_4$ 0,035 %). Anschließend Überführung der Suspension in ein gestopftes 100 ml-Kölbchen und Schütteln bei 30°C für 3-4 Tage.

Die so gewonnenen Asci wurden vom Sporulationsmedium befreit und in P mit Schneckenenzym (Fabrikat Industrie Biologique Française) einige Stunden behandelt, bis die Ascus-Wände aufgelöst waren. Anschließend konnten die Sporen auf einer YP-Schicht zerlegt und verteilt werden.

Die aufgewachsenen Sporenkulturen wurden z.T. in Rasterform auf YP-Medium übertragen und durch Stempeln auf Mangelmedium auf ihre Bedürftigkeit geprüft. Die Analyse des Paarungstyps erfolgte wie in HAEFNER 1964c beschrieben. - Die Ausbeute an vitalen Sporen betrug bei unbestrahlten Diplonten und Tetraplonten mindestens 90 %, bei Triplonten war sie teilweise schlechter.

2.7. Durchführung der Bestrahlungen

Alle Bestrahlungen erfolgten in Petrischalen von 3 cm Ø, die Schichtdicke der bestrahlten Suspension betrug ca. 2 mm. Während der Bestrahlungen wurde das Bestrahlungsgut magnetisch gerührt.

Bestrahlungsquellen: Für ultraviolettes Licht der Wellenlänge 254 nm kam eine Entkeimungslampe HNS 12 (Osram), die sich in einem Blechgehäuse mit Fenster und Fensterverschluß befand, zur Anwendung. Für Röntgenbestrahlungen wurde ein Machlett-Rohr (Typ OEG 60, W-Anode, Be-Fenster) ohne zusätzliche Filterung, betrieben mit 50 kV und 9 mA benutzt, der Abstand Be-Endfenster - Unterkante Bestrahlungsschale betrug 15 cm.

Alle Bestrahlungen erfolgten in Luft. Durch das Rühren und das günstige Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von ca. 7 : 2 (cm^{-1}) wurde für eine gute Durchlüftung der Suspension während der Bestrahlung gesorgt (siehe dazu auch 2.8.2.). Es wurde stets bei Raumtemperatur bestrahlt. Diese schwankte für die UV-Bestrahlungen zwischen 22°C und 28°C, für die Röntgenbestrahlung zwischen 20°C und 24°C. Diese Schwankungen waren durch die unklimatisierten Räume gegeben. Sie sollten jedoch nach WOOD 1954, der den Temperaturkoeffizienten für die Rö-Inaktivierung untersuchte, einen nur sehr geringen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit haben.

2.8. Bestimmung der wirksamen Strahlendosis

Bei Benutzung der für Mutationsexperimente nötigen Suspensionen mit hohen Titern, im Bereich $5 \cdot 10^7$ Zellen/0,1 ml, ist zu prüfen, inwieweit die auf die Oberfläche einer solchen Suspension treffenden Dosis identisch ist mit der am Zellort wirksamen. Für UV ist dabei mit einer "Schattenwirkung" und für Röntgenstrahlen möglicherweise mit Effekten zu rechnen, die mit der Wirkung ionisierender Strahlen über Wasserradikale sowie mit dem Sauerstoffgehalt in der Suspension in Zusammenhang zu bringen sind. - Welche Beziehung zwischen Oberflächendosis und am Zellort wirksamer Dosis für UV- und Röntgenstrahlen in den benutzten Saccharo-

myces-Suspensionen besteht, wird in den folgenden Abschnitten dargelegt.

2.8.1. Wirksame UV-Dosis

Wie bereits in HAEFNER 1961 und HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 dargestellt, ist die auf die Oberfläche einer Saccharomyces-Suspension hohen Titers auffallende Dosis (Oberflächendosis) stets wesentlich größer als die am Ort der Einzelzelle wirksame Dosis. Die durch die "Schattenwirkung" bedingte Dosisreduktion ist bei bekanntem Titer vom Zellvolumen und damit vom Ploidiegrad der betreffenden Stämme abhängig. Dadurch ist es nicht direkt möglich, die UV-induzierten Mutationsraten von Stämmen verschiedenen Ploidiegrades bei der gleichen wirksamen Dosis aufzunehmen. Es muß vielmehr stets erst die wirksame Dosis ermittelt werden. Diese Ermittlung kann auf zweierlei Weise erfolgen:

a) Nimmt man an, daß die UV-Inaktivierung in Saccharomyces-Suspensionen kleinen Titers (ca. 10^3 Zellen/0,1 ml) und in Suspensionen hohen Titers ($> 10^6$ Zellen/0,1 ml) durch den gleichen Mechanismus (z.B. direkte Treffer in DNS) erfolgt, so läßt sich der durch die "Schattenwirkung" bedingte Dosisreduktionsfaktor für den bestrahlten Stamm aus den Inaktivierungskurven bei hohem und niedrigem Titer ermitteln. Es ist dann möglich, aus der bekannten Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen in einer beliebig dichten Suspension über die Inaktivierungskurve in dünner Suspension direkt zur wirksamen Dosis zu gelangen. - In Abb. 1 sind die Inaktivierungskurven einiger Stämme der IV-bedürftigen Serien aufgetragen, die sich durch Bestrahlung in dichter und dünner Suspension ergaben[1]. Tab. 3 gibt in Spalte 3 die Dosisreduktionsfaktoren als Funktion der Überlebenden. Man erkennt, daß im Mittel ein Dosisreduktionsprinzip vorliegt. - Die UV-Inaktivierungskurven der unter-

1) Vorkultur und Behandlung der Stämme erfolgte in gleicher Weise wie bei den Mutationsexperimenten.

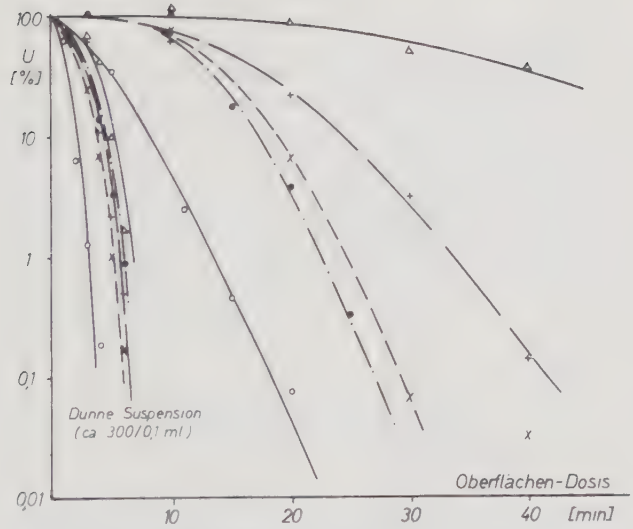


Abb. 1

UV-Inaktivierungskurven für fünf fast homozygote und isogene IV-bedürftige Stämme der Ploidieklassen p = 1 bis 4 bei Bestrahlung in dichter und dünner Suspension

Die Inaktivierungskurven wurden mit der für die Mutationsexperimente üblichen Methode aufgenommen. Sie zeigen im allgemeinen auch bei hohen Dosen keine "Schwanzbildung".

Stamm	Ploidiegrad	Symbol	gezählter Titer d. dichten Susp. $(0{,}1\ ml)^{-1}$
211-1aM	1	o	$9{,}0 \cdot 10^7$
211-1aM/2	2	•	$1{,}7 \cdot 10^7$
230	2	x	$3{,}0 \cdot 10^7$
301	3	Δ	$6{,}2 \cdot 10^7$
401	4	+	$2{,}7 \cdot 10^7$

Stamm	Überlebenswahrscheinlichkeit [%]	DRF (nach Abb.1)	Mittlerer DRF (nach Abb. 1) (A)	DRF (aus Gl 13) (B)	$\frac{B}{A}$
211-laM	10	4,0			
	1	4,2	4,2	7,8	1,9
	0,1	4,3			
211-laM/2	10	4,3			
	3	4,1	4,0	6,7	1,7
	1	3,9			
	0,3	3,7			
230	10	5,1			
	1	5,6	5,6	10,7	1,9
	0,1	6,0			
301	80	9,7			
	40	9,2	10,1	15,6	1,6
	20	11,2			
401	10	5,8			
	1	6,2	6,0	10	1,7
	0,3	6,1			

Tab. 3 Zur Dosisreduktion in UV-bestrahlten dichten und dünnen Suspensionen Die Dosis-Reduktions-Faktoren wurden zwar anhand der in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse, aber aus einer genaueren graphischen Darstellung entnommen.

suchten Stämme liegen innerhalb der Fehlerbereiche auf den von LASKOWSKI 1962 für die gleichen Stämme, jedoch unter anderen Vorkulturbedingungen angegebenen Kurven.

b) Neben der von Voraussetzungen abhängigen Methode a) ist es möglich, die Dosisreduktionsfaktoren aus spektralphotometrischen Messungen in folgender Weise abzuschätzen: Nimmt man zunächst vereinfachend an, daß die in der Tiefe L der Suspension wirksame UV-Dosis (D_L) exponentiell mit der Tiefe abnimmt, so ergibt sich

(11) $$D_L = D_o \, e^{-\alpha L} \quad ,$$

wobei α der Koeffizient der Gesamtabsorption der Suspension bei 254 nm und D_o die auf die Oberfläche auffallende Oberflächendosis ist. Setzt man voraus, daß sich jede Zelle durch das bei allen Bestrahlungen durchgeführte magnetische Rühren der Suspension zu jedem Zeitpunkt mit der gleichen Wahrscheinlichkeit an jedem Ort der Bestrahlungsschale aufhält, so ist die im Mittel auf eine beliebige Zelle auffallende wirksame Dosis

(12) $$D = \frac{1}{l} \int_0^l D_o \, e^{-\alpha L} \, dL = D_o \, \frac{1 - e^{-\alpha l}}{\alpha l} \quad .$$

l gibt die Gesamttiefe der Suspension an. Daraus erhält man für den zu erwartenden Dosisreduktionsfaktor

(13) $$DRF = \frac{D}{D_o} = \frac{1 - e^{-\alpha l}}{\alpha l} \quad .$$

Für die zur Aufnahme der Inaktivierungskurven in Abb. 1 benutzten Suspensionen wurde αl aus Messungen der Extinktion in einem BECKMAN Spektralphotometer ermittelt. Die aus Gl. (13) sich für die verschiedenen Stämme ergebenden Dosisreduktionsfaktoren sind in Spalte 5 der Tab. 3 eingetragen. Spalte 6 zeigt das Verhältnis der aus Gl. (13) und Abb. 1 ermittelten DRF; es ist für alle Stämme und Ploidieklassen recht ähnlich, liegt jedoch über 1. Dieser Wert ist verständlich, da der in Gl. (11) gemachte Ansatz streng nur für ausschließlich absorbierende Suspensionen gilt. Die gestreute Energie, die die Suspension nicht nach Mehrfachstreuung verläßt, sondern bedingt durch die spezifische Absorption der Zelle bei 254 nm zu einem gewissen Teil absorbiert wird,

liefert einen zusätzlichen Beitrag zu der am Ort der Zelle im Mittel wirksamen Dosis. Berücksichtigt man, daß ein großer Anteil der rückgestreuten Energie absorbiert wird, so ist der beobachtete Anstieg der Dosisreduktionsfaktoren zwischen den Werten aus Abb. 1 und den spektralphotometrischen Werten plausibel[1].

Gemeinsam mit den Ergebnissen der Mutationsexperimente, in denen sich bei Bestrahlung in dünnerer Suspension (ca. 10^6 Zellen/0,1 ml) die gleichen "Rückmutationsraten" wie bei Benutzung dichter Suspension ergaben, scheint das unter a) geschilderte Verfahren der Bestimmung der wirksamen UV-Dosis voll gerechtfertigt.

Für die IV-bedürftigen Stämme wurden zur Ermittlung der wirksamen Dosis die von LASKOWSKI 1962 veröffentlichten Kurven herangezogen, da diese statistisch besser belegt sind und sich - wie verschiedene Experimente zeigten - nicht von den nach der hier benutzten Methode erhaltenen Kurven unterscheiden. Für die anderen Stämme wurden die wirksamen Dosen aus eigenen Inaktivierungskurven in dünner Suspension ermittelt.

Im allgemeinen erfolgte die Bestrahlung der dichten Suspensionen wie in HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 mit einer auf die Oberfläche auffallende Energieflußdichte von

$$530 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1} \pm 10\ \% \quad .$$

Für die wirksame Dosis wurden alle Werte entsprechend der in LASKOWSKI 1962 angegebenen Energieflußdichte so umgerechnet, daß stets

$$1 \text{ min} = 91 \text{ erg cm}^{-2} \quad \text{war.}$$

---

1) Eine exakte Ermittlung der pro Zelle bei den gegebenen Verhältnissen absorbierte Energie stößt auf experimentelle Schwierigkeiten, da dafür die Winkelabhängigkeit der Streuung der als Ellipsoide zu behandelnden Zellen bekannt sein müßte. Diese ist wegen der speziellen geometrischen Bedingungen der Bestrahlungsanordnung (flache, breite Schicht) von ausschlaggebender Bedeutung.

2.8.2. Wirksame Röntgendosis

Im Gegensatz zu UV konnte nach Röntgenbestrahlung kein Einfluß der hier benutzten Titer ($< 10^8$ Zellen/0,1 ml) auf die Inaktivierung festgestellt werden, wie Abb. 2 für 3 Stämme der IV-bedürftigen Serie zeigt[1]. In gleicher Weise wirkte auch eine Veränderung der Zellkonzentration von ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen/0,1 ml auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/0,1 ml bei den Röntgenbestrahlungen nicht auf die röntgeninduzierten Mutationsraten.

Damit erscheint gesichert, daß bei Röntgenbestrahlung kein störender Einfluß durch die benutzten Zelltiter sowie durch die ploidiegradabhängige Massenkonzentration bei konstantem Titer auftritt.

Die verwendete Dosisleistung der Machlett-Röhre betrug bei 50 kV Röhrenspannung und 9 mA Anodenstrom 10 kr/min.

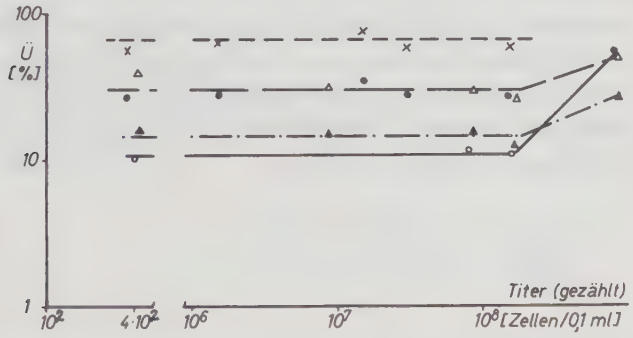


Abb. 2

Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Röntgenbestrahlung vom Titer der bestrahlten Suspension.

Vorkultur, Behandlung und Medium wurden wie bei den Mutationsexperimenten ausgeführt. Haplont (211-1aM): x 10 kr, • 20 kr Diplont (230): △ 150 kr, ▲ 200 kr; Triplont (301): o 150 kr.

---

1) GUNTHER u. KOHN 1956 berichten über eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit von diploiden Saccharomyces-Zellen in Zellsuspensionen mit Titern über ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/0,1 ml, wogegen für Haplonten kein derartiger Effekt bis zu Titern von 10^8 gefunden wurde. Bei diesen Experimenten wurde nicht für ausreichende Sauerstoffzufuhr gesorgt. Wurde das Bestrahlungsgut in Luft geschüttelt, so zeigten auch die Diplonten bis zu Titern von $2 \cdot 10^7$ konstante Überlebenswahrscheinlichkeit.

2.9. Methoden zur Fehlerabschätzung

Im folgenden sollen die Verfahren angegeben werden, die angewandt wurden, um die Fehlerabschätzung durchzuführen. Auf die Anwendung einer exakten Fehlerrechnung wurde verzichtet, da bei der Versuchsdurchführung systematische Fehler nicht völlig auszuschließen sind (Schwankungen in der Physiologie der Zellen, Unterschiede in der Struktur der Medien etc.) und die Aufarbeitung des vorliegenden, umfangreichen Material einen im Vergleich zu dem zu erzielenden Ergebnis nicht zu rechtfertigenden Aufwand erfordert.
Für die unter 3.2. und 3.3. und 3.4. mitgeteilten Ergebnisse wurde gänzlich auf eine Fehlerabschätzung verzichtet, da das Material teilweise recht klein ist (3.2. und 3.4.) oder im Hinblick auf die hier interessierenden Fragen nur größenordnungsmäßige Aussagen von Wichtigkeit sind (3.3.).

2.9.1. Fehlerabschätzung für die spontanen Mutationsraten

Werden die spontanen Mutationsraten nach der p_0-Methode bestimmt, und wählt man, wie hier durchgeführt, $p_0 \approx 0{,}2$, so ergibt sich nach LEA und COULSON 1949 ein statistischer Fehler der spontanen Mutationsrate von

$$\frac{\Delta a}{a} = \pm \frac{1{,}3}{\sqrt{C}} \quad , \tag{14}$$

wobei C die Zahl der in einem Experiment angesetzten Kulturen ist. Zu diesem Fehler kommt noch der durch die Bestimmung von N, dem Endtiter, aus den Titern von jeweils 3 Röhrchen eines Versuchs. Dieser soll pauschal mit $\pm$ 10 % abgeschätzt werden. Für den Gesamtfehler ergibt sich dann

$$\frac{\Delta a}{a} = \pm \left(\frac{1{,}3}{\sqrt{C}} + 0{,}1 \right) \tag{15}$$

Wurden mehrere Bestimmungen von a ($a_1, a_2, \ldots$) durchgeführt, so wurde der Fehler des Mittelwertes aller dieser s Bestimmungen aus

$$(16) \qquad \frac{\Delta a}{a} = \pm \frac{1}{s} \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)_1 + \left(\frac{\Delta a}{a}\right)_2 + \ldots}$$

ermittelt.

2.9.2. Fehlerabschätzung für die strahleninduzierten Mutationsraten

Die Abschätzung des relativen Größtfehlers der Mutationsraten nach Bestrahlung erfolgte wie in HAEFNER 1961 abgeleitet.

Es wurden die Streubereiche $\Delta m/m$ für die Röntgenstrahleninduzierten bzw. die Streubereiche ρ - in denen der durch die Ermittlung der wirksamen Dosis aus der Überlebenswahrscheinlichkeit bedingte Fehler mitberücksichtigt wird - für die UV-induzierten Mutationsraten nach folgenden Gleichungen bestimmt:

$$(17) \qquad \frac{\Delta m}{m} = \pm \left(\frac{\sqrt{Z(N)}}{Z(N)} + \frac{\sqrt{Z(a')}}{Z(a')} + \frac{\sqrt{Z(\ddot{u}')}}{Z(\ddot{u}')} \right)$$

$$(18) \qquad \rho = \pm \left(\frac{\Delta m}{m} + \frac{m(D) - m(D + \Delta D)}{m(D)} \right) .$$

Z() gibt die Zahl der im Mittel bei einem typischen Versuch zur Ermittlung der in () stehenden Größe (siehe dazu 2.3.3.1.) gezählten Kolonien an.

$$(19) \qquad \Delta D = \pm \frac{D \sqrt{Z(\ddot{u}')}}{Z(\ddot{u}')} .$$

ist der Größtfehler der wirksamen Dosis, der durch die indirekte Dosisbestimmung entsteht.
Gl. (17), (18) u. (19) sind Vereinfachungen der Gl. (26), (27) u. (30) in HAEFNER 1961, die bereits berücksichtigen, daß der Anteil der spontanen "Rückmutanten" hier stets klein ist und daß die zur Bestimmung der wirksamen Dosis benutzten UV-Inaktivierungskurven statistisch recht gut gesichert sind.
Der sich aus den durchgeführten Verdünnungen ergebende Fehler wurde für alle m-Werte zusätzlich mit pauschal ± 10 % angesetzt. Dieser Ansatz scheint sinnvoll, da im Mittel für die Ermittlung jedes m-Wertes 2 x 3 = 6 Verdünnungen angelegt wurden, und der Fehler der Einzelverdünnung mit 2 % angesetzt werden kann.

$\frac{\Delta m}{m} + 0{,}1$ bzw. $\varrho + 0{,}1$ wurden jeweils für typische Dosen und typische Versuche ermittelt und als Fehlerbereich von den mittleren Kurven aus eingetragen. Die Verbindung der Ränder dieser Streubereiche für verschiedene Dosen ergab die in den Abbildungen eingetragenen Streubereichskurven.

3. Ergebnisse und Diskussion der Teilergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen von Experimenten mitgeteilt und im Hinblick auf spezielle Fragen diskutiert. Eine allgemeinere Diskussion der unter 1. erörterten Probleme der Hefe-Inaktivierung und ihrer Beschreibbarkeit durch mathematische Modelle wird in 4. durchgeführt.

3.1. Zur Ploidiegradabhängigkeit von Mutationsraten

Im folgenden sollen die Ergebnisse über die spontane und UV- bzw. Röntgenstrahlen-induzierte Mutabilität in Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades und unterschiedlicher genetischer Konstitution mitgeteilt werden. Bedingt durch die Schwierigkeiten, die beim Aufbau von Stammsystemen mit höheren Ploidiegraden entstehen, wurden nur zwei "Rückmutationen" in Stämmen der Ploidiegrade p = 1 bis 4 untersucht.

3.1.1. Die spontane Mutabilität fast isogener und homozygoter Saccharomyces-Stämme der Ploidieklassen p = 1 bis 4

Neben der Untersuchung der Ploidiegradabhängigkeit strahleninduzierter Mutationsraten erschien es wichtig zu prüfen, inwieweit für die spontane Mutabilität eine Konstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz in Stämmen verschiedener Ploidie gegeben ist.

3.1.1.1. Ergebnisse

Die spontanen "Rückmutationsraten" für Mutationen zur Isoleucin-Valin-Prototrophie wurden für 5 Stämme der Ploidieklassen p = 1 bis 4 nach Gleichung (4) bzw. (6) (siehe 2.3.2.) ermittelt (Tab. 4)[1]. Im allgemeinen wurden in einem Experiment zwei Stämme verschiedenen Ploidiegrades gleichzeitig untersucht.

---

1) Das Serin-bedürftige Stammsystem war für die Bestimmung spontaner Mutationsraten relativ ungeeignet, da bei diesen Stämmen nach der ersten Zählung zahlreiche kleine, nicht echt prototrophe Kolonien aufwachsen.

Stamm	Zahl der Experimente	Mutationsrate a nach p_0-Methode	Verhältnis der Mutationsraten (aus p_0) zu der des Haplonten	Mutationsrate a nach r-Methode
211-1aM (hapl.)	7	$(4,5 \pm 0,54) \cdot 10^{-9}$	1	$3,0 \cdot 10^{-9}$
211-1aM/2 (dipl. αα)	8	$(9,8 \pm 1,4) \cdot 10^{-9}$	2,2	$6,6 \cdot 10^{-9}$
230 (dipl. αa)	5	$(6,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-9}$	1,4	$3,4 \cdot 10^{-9}$
301 (tripl.)	2	$(9,0 \pm 2,1) \cdot 10^{-9}$	2,0	$5,9 \cdot 10^{-9}$
401 (tetrapl.)	8	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$	0,78	$2,3 \cdot 10^{-9}$

Tab. 4 Spontane Mutationsraten für die "Rückmutation" zur IV-Prototrophie in Stämmen der Ploidieklassen p = 1 bis 4
Zur Methode siehe 2.3.2., zur Ermittlung der Fehler siehe 2.9.1.

3.1.1.2. Diskussion

Ein Vergleich der in Tab. 4 für Haplonten und Diplonten angegebenen spontanen Mutationsraten mit den sonst für Saccharomyces nach ähnlichen Verfahren ermittelten Werten (MAGNI u. von BORSTEL 1962, MAGNI 1963, HAEFNER 1961) zeigt, daß die Mutationsraten in der auch sonst beobachteten Größenordnung liegen.

Die systematischen Unterschiede zwischen den nach der p_0- und der r-Methode bestimmten Mutationsraten - a aus r ca. 65% von a aus p_0 - waren, wie bereits in 2.3.2. angedeutet, zu erwarten, da für Saccharomyces die für die r-Methode gemachten Voraussetzungen, daß aus jeder Mutante eine Kolonie gebildet wird, wegen der Verklumpung der Zellen nicht 100 %ig erfüllt ist. Dadurch ist die mittlere Zahl der Mutanten/Platte r und die daraus bestimmte Mutationsrate a stets zu klein.

Die r-Methode ist also für Absolutbestimmungen beim vorliegenden Material ungeeignet. Sie wird auch für Relativbestimmungen dann unbrauchbar, wenn sich, was hier nicht der Fall ist, der Gehalt an Doppelzellen und Klumpen in den zu vergleichenden Stämmen in der exponentiellen Wachstumsphase stark unterscheidet.

Bezüglich der Ploidiegradabhängigkeit kann man aus Tab. 4 folgern, daß die "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz nicht in allen Ploidieklassen konstant ist. Für Haplonten und Diplonten fanden MAGNI u. von BORSTEL 1962 und MAGNI 1963 stets eine derartige Konstanz, wobei die dort angegebenen Werte jedoch teilweise von dem erwarteten 1 : 2 Verhältnis um bis zu 25 % abwichen. Für das vorliegende Material kann als gesichert gelten, daß vom Haplonten zum αα-Diplonten ein Anstieg um den Faktor 2 vorhanden ist. Für den aα-Diplonten wurde ein Anstieg um den Faktor 1,4 ermittelt. Der Triplont hat die gleiche Mutationsrate wie der αα-Diplont. Fehlergesichert ist, daß der Tetraplont keine höhere Mutationsrate als der Haplont hat.

Zur Erklärung dieser Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. Chromosomensatz in Stämmen höheren Ploidiegrades lassen sich u.a. folgende Modelle diskutieren:

a) Nur ein Teil der prototrophen "Rückmutanten" entsteht durch dominant wirkende Mutationen.

b) Es gibt genetische Mechanismen, die dazu führen, daß sich in Stämmen höherer Ploidieklassen nicht alle primär entstandenen Mutationen phänotypisch ausprägen.

c) Ein Teil der "Rückmutationen" besteht aus Mutationen, die den entsprechenden Block[1)] nicht aufheben, sondern Isoleucin und Valin auf physiologischen Umwegen herstellen. Die synthetisierte Menge ergibt nicht die in der Zelle notwendige Normalkonzentration, das Aufwachsen zu makroskopi-

---

1) Über den Block der Isoleucin-Valin-Synthese der bei den vorliegenden Stämmen zur IV-Auxotrophie führt, ist trotz Untersuchungen von KARKAR (Texas) und KOHLHAW (Freiburg) bisher nichts bekannt.

schen Kolonien wird bevorzugt in Stämmen höherer Ploidieklassen verzögert, da dort, bezogen auf den nach der Mutation nur einfach vorliegenden prototrophen Chromosomensatz ein größerer Bedarf besteht[1].

d) Die Mutationsrate pro Gen bzw. pro Chromosomensatz ist primär in Stämmen verschiedenen Ploidiegrades verschieden.

Eine Entscheidung zwischen diesen verschiedenen Erklärungen ist bisher nicht möglich, da auf eine genauere genetische sowie biochemische Untersuchung der spontanen "Rückmutanten" verzichtet werden mußte. - Recht unwahrscheinlich ist die Möglichkeit a), da eine größere Beteiligung rezessiver Mutationen bereits keinen Anstieg der Mutationsraten vom Haplonten zum Diplonten ergeben würde. Eigene genetische Analysen, in denen spontan entstandene IV-prototrophe Haplonten mit IV-auxotrophen haploiden Zellen des Stammes 230-1c gekreuzt und die entstandenen diploiden Zygoten auf ihre IV-Bedürftigkeit hin überprüft wurden, sprechen ebenfalls dagegen. - Für die Möglichkeit c) sprechen Beobachtungen über das Nachwachsen von Mutanten nach der 5 - 7 Tage-Zählung. Läßt man nämlich die beimpften Platten bis zu 15 - 18 Tagen bei 30°C, zählt sie dann erneut aus und ermittelt die spontane Mutationsrate nach der p_0-Methode, so ergibt sich für den haploiden Stamm gegenüber der ersten Zählung ein Anstieg um den Faktor 3,3 , während die Mutationsrate für den Tetraplonten nur um den Faktor 1,6 wächst. Dieses unterschiedliche Nachwachsen von prototrophen Kolonien ist in Übereinstimmung mit der Erklärung c), wenn man annimmt, daß es sich bei den nachgewachsenen um inokulierte Mutanten handelt, die Isoleucin und Valin auf Umwegen herstellen.

Der Einwand, daß die Abweichungen in Tri- und Tetraplonten durch Aneuploidie dieser Stämme für das betreffende Chromosom bedingt sein könnte, wird durch die im nächsten Kapitel

---

1) Siehe dazu auch die an UV-induzierten "Rückmutanten" durchgeführten Untersuchungen über "Semidominanz" in 3.1.3.2.

mitgeteilten Ergebnisse der röntgenstrahlen-induzierten Mutabilität sowie durch den Aneuploidien ausschließenden Aufbau des Stammsystemes entkräftigt.

3.1.2. Zur Röntgenstrahlen-induzierten Mutabilität verschiedener Saccharomyces-Stämme.

Die Untersuchung der Ploidiegradabhängigkeit strahleninduzierter Mutationen in fast isogenen und homozygoten Stämmen verschiedenen Ploidiegrades erscheint nur sinnvoll, wenn es wahrscheinlich ist, daß die nicht völlige Isogenie und Homozygotie keinen wesentlichen Einfluß auf die Mutationsraten hat. Es ist daher zuerst wichtig, den Einfluß von kleinen definierten genetischen Veränderungen auf die Röntgenstrahlen-induzierten Mutationsraten zu untersuchen. Wie sich aus der Untersuchung zahlreicher Stämme ergab (siehe 3.1.2.1.) haben die in den zwei verwendeten Stammsystemen vorhandenen Anisogenien bzw. Heterozygotien keinen Einfluß auf die Mutationsraten, so daß diese Stammsysteme für die Untersuchung der Ploidiegradabhängigkeit geeignet erscheinen. - Daneben wurden aber auch genetische Veränderungen in anderen Stämmen gefunden, die einen Einfluß auf die Mutabilität ausüben.
Sämtliche Mutationsraten wurden nach Gleichung (7) (in 2.3.3.) bestimmt.

3.1.2.1. Mutationsraten als Funktion des genetischen Hintergrundes

Vergleicht man die Mutationsraten für definierte genetische Veränderungen in unterschiedlichen Stämmen einer Mikroorganismenrasse, so können sich beträchtliche Unterschiede ergeben (siehe zusammengestellt z.B. bei KAPLAN 1959). Große Veränderungen der Mutationsraten konnten bereits durch eine einzige spontan aufgetretene Mutation in einem haploiden Saccharomyces-Stamm gefunden werden, wie Abb. 3 für die "Rückmutation" von der Histidin-Auxotrophie zur Prototrophie zeigt. Die im Stamm R 154 spontan aufgetretene Mutation zur Adenin-Prototrophie ergibt eine Veränderung der

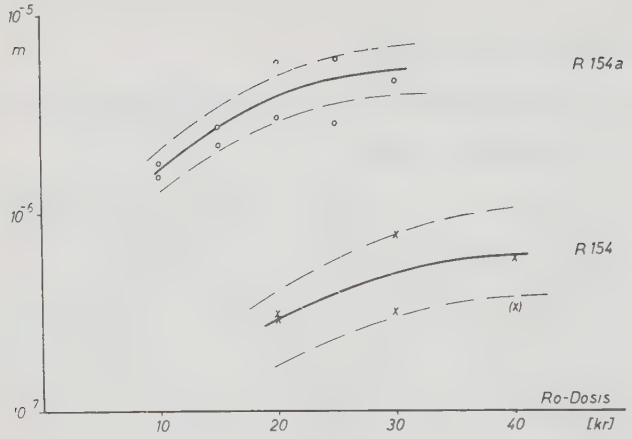


Abb. 3
"Rückmutationsraten" für die Mutation von der Histidin-Auxotrophie zur Prototrophie in zwei fast isogenen haploiden Saccharomyces-Stämmen, die sich nur dadurch unterscheiden, daß der eine (R 154) Adenin-auxotroph und der andere (R 154a) Adenin-prototroph ist.

"Rückmutationsraten" um ca. eine Zehnerpotenz. - Die Überlebenswahrscheinlichkeiten werden von der vorliegenden genetischen Veränderung nicht beeinflußt (Abb. 4).

Die in den Stämmen R 154 und R 154a im Prinzip mögliche Untersuchung der "Rückmutation" zur Uracil-Prototrophie erwies sich als experimentell undurchführbar, da nur sehr wenige Uracil-prototrophe "Rückmutanten" nach Röntgenbestrahlung beobachtet wurden.
Neben der in haploiden Stämmen festgestellten großen Veränderung einer Röntgenstrahlen-induzierten Mutationsrate durch den genetischen Hintergrund ergaben die in dem System der Isoleucin-Valin-bedürftigen Stämme vorhandenen Anisogenien keinen signifikanten Einfluß, wie die Abb. 5 und 6 zeigen.

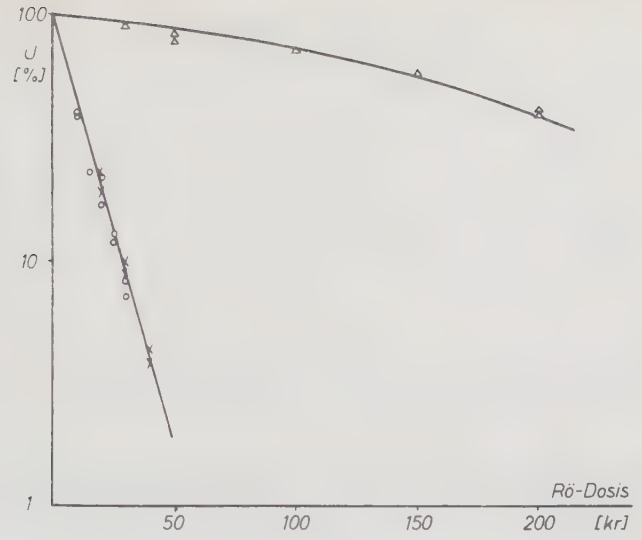


Abb. 4
Rö-Inaktivierungskurven der Stämme R 154 (x) und R 154a (o) und des aus dem Stamm R 154 hervorgegangenen Diplonten R 154/2 (Δ)

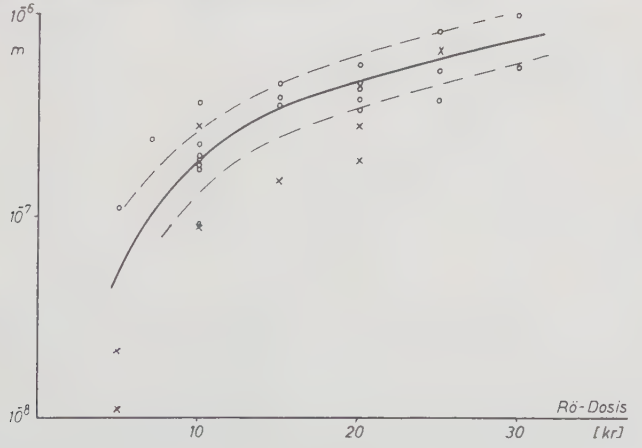


Abb. 5
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für zwei fast isogene und homozygote Haplonten vom Paarungstyp a bzw. α. 211-1aM (α) = o , 230-1c (a) = x.

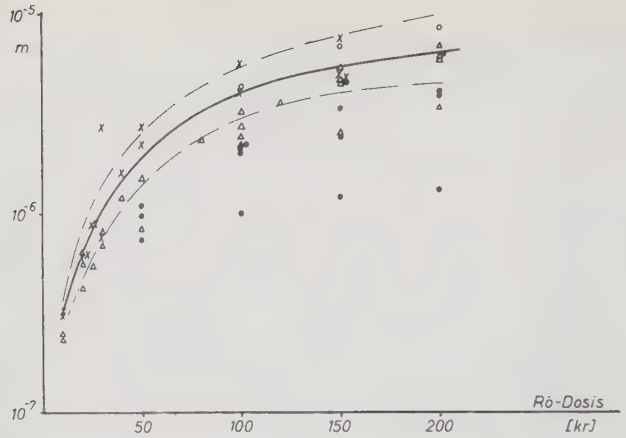


Abb. 6
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für vier fast isogene und homozygote Diplonten unterschiedlicher Paarungstypkonstitution. 211-1aM/2 (αα) = x; 401-51d (αα) = o; 230-1c/2 (aa) = • und 230 (αa) = Δ . Der eingetragene Streubereich bezieht sich auf die Werte des Stammes 211-1aM/2. Die Streubereiche der anderen Stämme liegen in der gleichen Größenordnung.

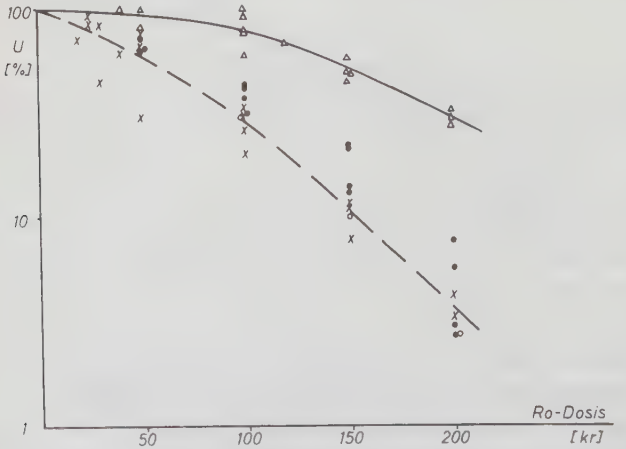


Abb. 7
Rö-Inaktivierungskurven der vier fast isogenen und homozygoten Diplonten unterschiedlicher Paarungstypkonstitution. 211-1aM/2 (αα) = x; 230-1c/2 (aa) = •; 401-51d (αα) = o und 230 (αa) = Δ .

Obwohl die Paarungstypallel-Konstitution, wie Abb, 7 erkennen läßt, in den Diplonten einen Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hat ("aα-Effekt", siehe LASKOWSKI 1962), konnte für die 3 untersuchten Diplonten kein signifikanter Unterschied in den Mutationsraten gefunden werden (Abb. 6). Die etwas kleineren Mutationsraten des Stammes 230-1c/2 lassen sich möglicherweise mit der etwas größeren Resistenz bezüglich der Rö-Inaktivierung korrelieren(Abb. 7).

Zum gleichen Ergebnis führt die Untersuchung der "Rückmutationsraten" für die Mutationen zur Serin-Prototrophie in 3 Diplonten der Serin-bedürftigen Stammserie (Abb. 8), die bezüglich der Inaktivierung ebenfalls den aα-Effekt zeigen (Abb. 9).
Die Untersuchung des Einflusses des AS-Effekts (LASKOWSKI 1962) auf Mutationsraten war nur durch einen Vergleich von Stämmen möglich, die entweder IV- und Se-bedürftig oder nur IV-bedürftig waren. Wie Abb. 10 zeigt, ist der durch die Serin-Prototrophie des Stammes 230 bedingte AS-Effekt bezüglich der Inaktivierung recht klein, da alle 3 Stämme bereits eine gesteigerte Röntgenstrahlenresistenz wegen ihrer IV-Bedürftigkeit zeigen. Die in Abb. 10 dargestellten Inaktivierungskurven wurde im Gegensatz zu der hier sonst verwandten Technik in Anlehnung an die von LASKOWSKI 1962 angegebene Methode durch Anzucht der Stämme in YPf über 48 Std. auf dem Schüttler und Plattieren auf YP-Medium erhalten. Benutzt man die für alle Mutationsexperimente verwandte Technik (siehe 2.3.3.a) zur Aufnahme der Inaktivierungskurven, so ergibt sich Abb. 11. Man erkennt deutlich eine Umkehr der Röntgenempfindlichkeiten der Stämme gegenüber Abb. 10 (kurz "inverser AS-Effekt" genannt). Dieser inverse AS-Effekt wurde auch für die von LASKOWSKI 1962 verwandten Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 gefunden(Abb. 12). - Ein Einfluß des inversen AS-Effekts auf die "Rückmutationsraten" für die Mutationen von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie konnte, wie Abb. 13 zeigt, nicht festgestellt werden.

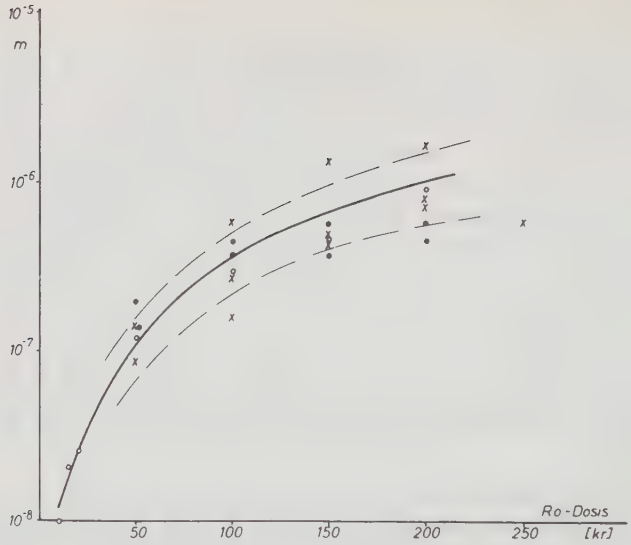


Abb. 8
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Se-Auxotrophie zur Prototrophie in Diplonten, die bis auf die Paarungstypkonstitution fast homozygot und isogen sind.
211-1bN/2 (aa) = x; 219 (αa) = o; 400-53d (αa) = ● .

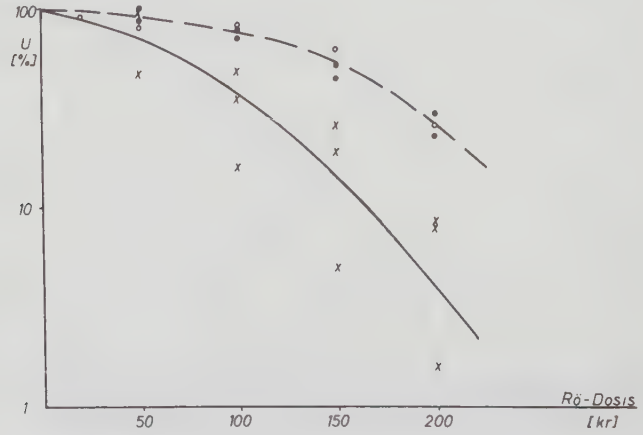


Abb. 9
Rö-Inaktivierungskurven für die drei fast isogenen und homozygoten Diplonten unterschiedlicher Paarungstypkonstitution.
211-1bN/2 (aa) = x; 219 (αa) = o; 400-53d (αa) = ● .

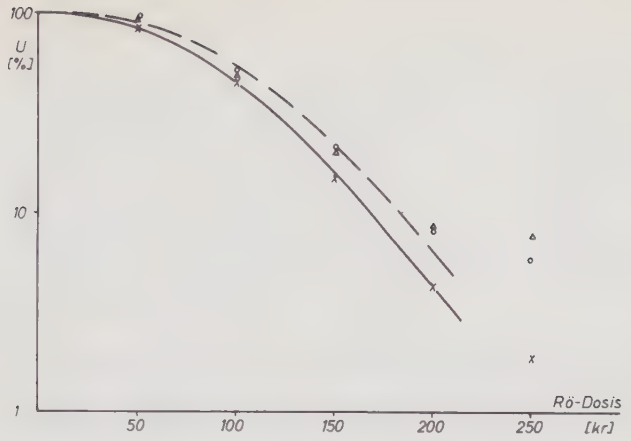


Abb. 10
Rö-Inaktivierungskurven von drei aα-Diplonten, die alle IV-auxotroph sind, von denen jedoch zwei (410-6d u. 410-12a) zusätzlich Se-auxotroph sind. Normaler "AS-Effekt". Vorpassage: YPf, Anzucht auf Schüttler. Ausplatten auf YP-Medium.
230 [Se iv] = x; 410-12a [se iv] = o; 410-6d [se iv] = Δ.

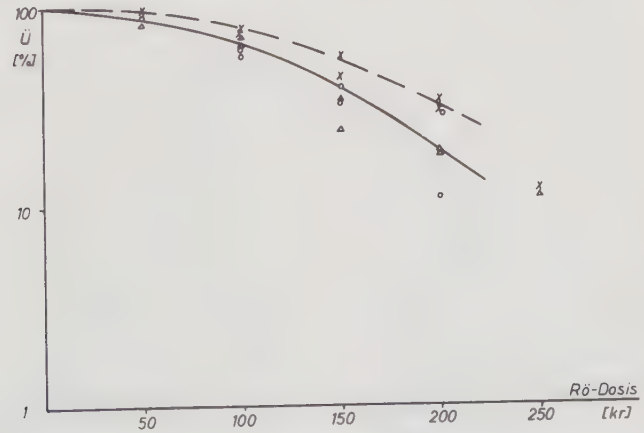


Abb. 11
Rö-Inaktivierungskurven für drei aα-Diplonten, die alle IV-auxotroph sind, von denen jedoch zwei (410-6d u. 410-12a) zusätzlich Se-auxotroph sind. "Inverser AS-Effekt".
Vorpassage: YP-Medium (fest), Kulturen 14 Tage alt. Ausgeplattet auf W-Medium.
230 [Se iv] = x; 410-12a [se iv] = o; 410-6d [se iv] = Δ.

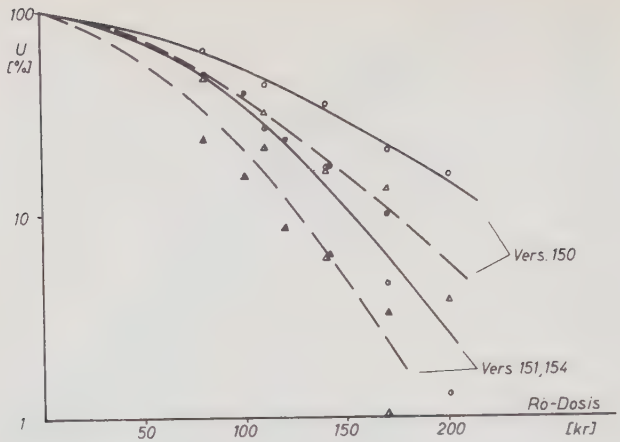


Abb. 12
"Inverser AS-Effekt", wie er sich unter Anwendung der für alle Mutationsexperimente benutzten Technik ergibt.
(Ausplattung auf W-Se-Medium)
211-1a/2 [IV] = o (Vers. 150); ● (151); ● (154)
211-1aM/2 [IV] = Δ (Vers. 150); ▲ (151); ▲ (154)

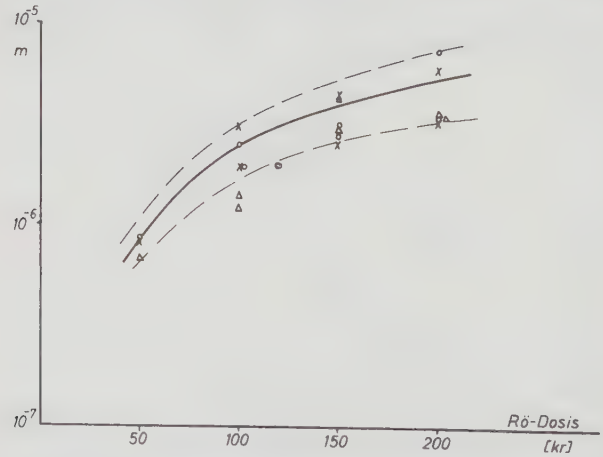


Abb. 13
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für drei antisogene aα-Diplonten. Für 230 wurden nur die in den gleichen Versuchen ermittelten Mutationsraten eingetragen. Streubereiche beziehen sich auf den Stamm 230.
230 [Se iv] = x; 410-12a [se iv] = o; 410-6d [se iv] = Δ .

3.1.2.2. Mutationsraten als Funktion des Ploidiegrades

Nachdem es durch die in 3.1.2.1. dargelegten Ergebnisse als ziemlich sicher gelten kann, daß die in den beiden Stammsystemen vorhandenen Anisogenien und Heterozygotien keinen wesentlichen Einfluß auf die Röntgenstrahlen-induzierte Mutabilität haben, erschien eine Untersuchung der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" in diesen Systemen sinnvoll.

Die Abb. 14 und 15 zeigen die Mutationsraten für die "Rückmutation" zur IV-Prototrophie in dem tri- und tetraploiden Stamm. In Abb. 16 sind die in Abb. 5, 6, 14 und 15 eingetragenen "besten" Kurvenverläufe zusammengezeichnet. Es ist ein deutlicher Anstieg der Röntgenstrahlen-induzierten Mutationsraten mit dem Ploidiegrad von p = 1 zu p = 2 zu erkennen.

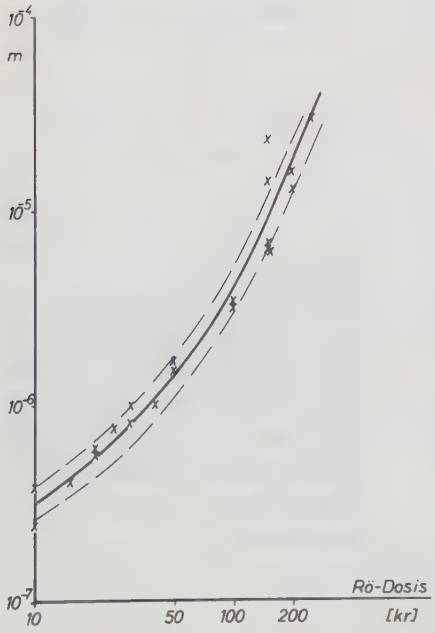


Abb. 14
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für den triploiden Stamm 301 in doppelt logarithmischer Darstellung.

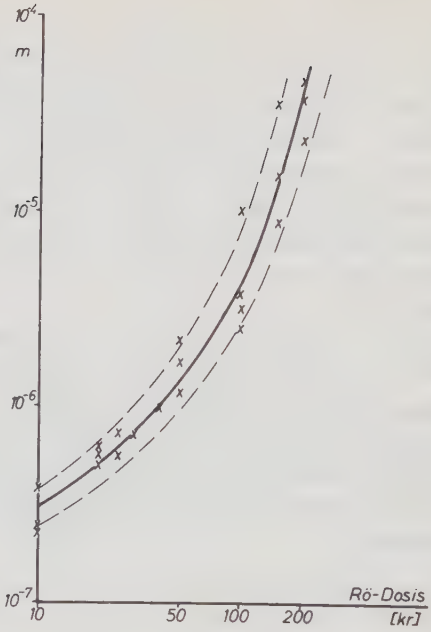


Abb.15
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für den tetraploiden Stamm 401.

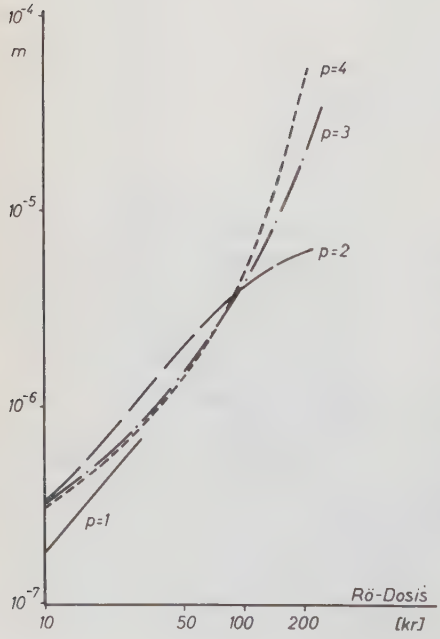


Abb. 16
Ploidiegradabhängigkeit der Röntgenstrahlen-induzierten "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie. Die eingetragenen Kurven sind aus den Abb. 5,6,14 und 15 entnommen.

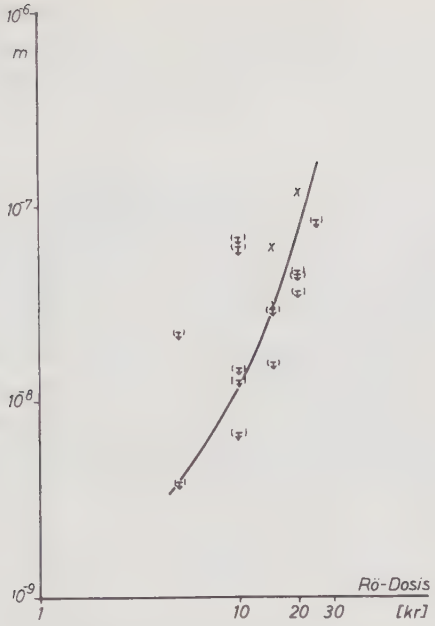


Abb. 17
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Se-Auxotrophie zur Prototrophie für den haploiden Stamm 211-1bN. Wegen der sehr kleinen beobachteten Mutantenzahlen, konnten in einigen Experimenten keine gesicherten Mutationsraten bestimmt werden. Es war jedoch möglich obere Schranken für die Raten anzugeben. Derartige Werte wurden mit dem Symbol (↧) eingetragen. Die eingetragene Kurve stellt die obere Schranke der "Rückmutationsraten" dar, die eigentliche mittlere Kurve kann tiefer liegen.
Auf eine Abschätzung des recht breiten Fehlerbereichs wurde verzichtet.

Die Ergebnisse für die "Rückmutation" zur Serin-Prototrophie in den untersuchten haploiden, tri- und tetraploiden Stämmen zeigen die Abb. 17, 18 und 19. In Abb. 20 sind wieder die "besten" Kurven aus den Abb. 8, 17, 18 und 19 zusammengestellt.
Neben der Bestimmung von "Rückmutationsraten" in den beiden Stammsystemen wurde die Ploidiegradabhängigkeit für die "Rückmutation" zur Histidin-Prototrophie in den Stämmen R 154 und R 154/2 untersucht (Abb. 21). Die Inaktivierungskurven dieser beiden Stämme finden sich in Abb. 4.

Die Untersuchung neu abgeimpfter "Rückmutanten"-Kolonien (Wachstumstest in W-IV-Se-Medium (flüssig)) ergab, daß mehr als 90 % aller Röntgenstrahlen-induzierten "Rückmutanten", die innerhalb von 7 Tagen nach den Bestrahlungen auf dem Mangelmedium aufgewachsen waren, echt prototroph sind.

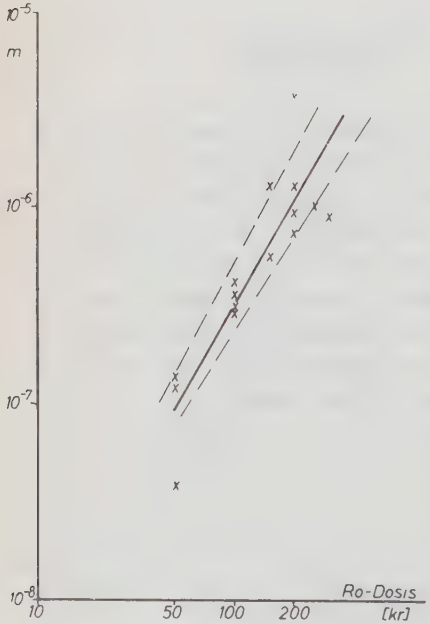


Abb. 18
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Se-Auxotrophie zur Prototrophie für den triploiden Stamm 300.

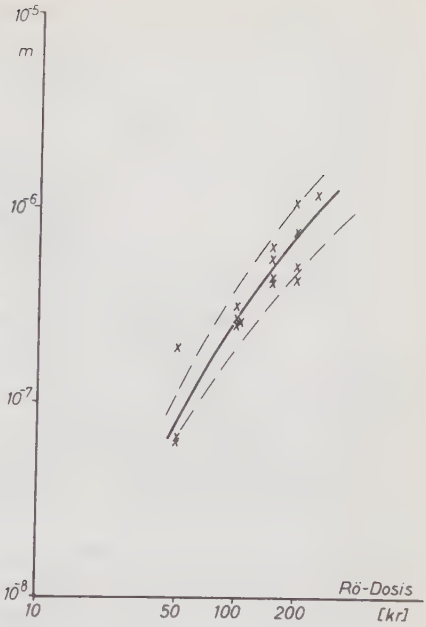


Abb. 19
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Se-Auxotrophie zur Prototrophie für den tetraploiden Stamm 400.

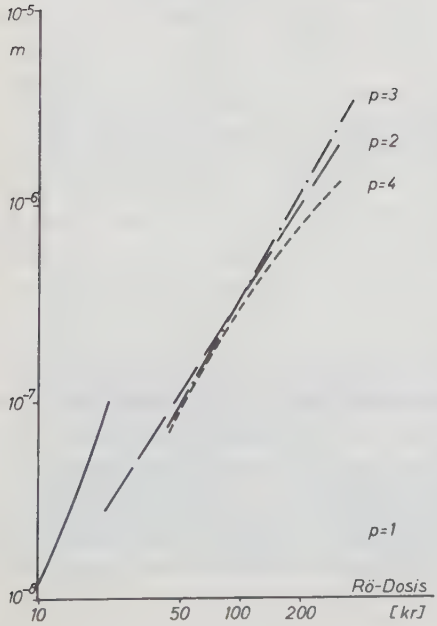


Abb. 20
Ploidiegradabhängigkeit der Rö-induzierten "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Se-Auxotrophie zur Prototrophie. Die eingetragenen Kurven sind aus den Abb. 8,17, 18 u. 19 entnommen. Die Kurve für den Haplonten stellt die obere Schranke der "Rückmutationsraten" für diesen Stamm dar (siehe Abb. 17).

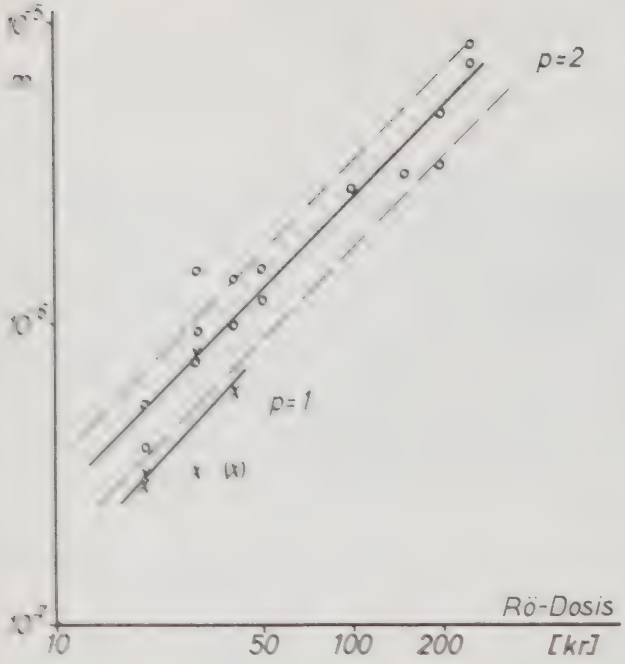


Abb. 21
Rö-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der Histidin-Auxotrophie zur Prototrophie für zwei fast isogene und homozygote Stämme der Ploidieklassen p = 1 (R 154 = x) und p = 2 (R 154/2 = o)

3.1.2.3. Diskussion

Die ermittelten Röntgenstrahlen-induzierten Mutationsraten für die Mutation von der Auxotrophie zur Prototrophie liegen in der Größenordnung der aus der Literatur bekannten Raten für Mutationen in Saccharomyces und Schizosaccharomyces (siehe z.B. MORTIMER u. BRUSTARD 1960, FRITZ-NIGGLI 1963, HESLOT 1962, ARMAN u. ARDASHNIKOW 1964), sie liegen jedoch um einige Zehnerpotenzen tiefer als die für Mutatio-

nen zu rezessiv letal wirkenden Genzuständen (LASKOWSKI u. HAEFNER 1963).

Da eine ausführliche genetische Analyse der "Rückmutanten" nicht durchgeführt wurde, muß in der ganzen Diskussion stets berücksichtigt werden, daß es sich bei den vorliegenden "Rückmutationsraten" möglicherweise um Summen aus Mutationsraten für die Mutationen mehrerer Loci handelt (siehe dazu auch 2.3.1.).

Die Dosisabhängigkeit der "Rückmutationsraten" unterscheidet sich für die drei untersuchten Mutationen. Für die "Rückmutation" zur Histidin-Prototrophie widersprechen die Werte der Diplonten nicht einer linearen Dosisabhängigkeit ($m \sim D$, für kleine m, Abb. 21). Dies ist in Übereinstimmung mit zahlreichen aus der Literatur bekannten Dosisabhängigkeiten für röntgeninduzierte Mutationsraten bei Mikroorganismen (Zusammenfassung siehe z.B. KAPLAN 1959, HAEFNER 1961), sowie für die von LASKOWSKI u. HAEFNER 1963 gefundene Dosisabhängigkeit der Mutationsraten zu einem rezessiv letal wirkenden Genzustand[1].

Die "Rückmutationsraten" für die IV-bedürftigen Stämme steigen nichtlinear mit der Dosis. Bis auf die Mutationsraten der diploiden Stämme gibt es keine ausgeprägten Sättigungseffekte bei hohen Dosen. Auffallend für die IV-bedürftigen Stämme ist die unterschiedliche Dosisabhängigkeit der "Rückmutationsraten" der Haplonten auf der einen und denen der Tri- und Tetraplonten auf der anderen Seite (Abb. 16). Diese Unterschiede in der Kinetik könnten darauf zurückzuführen sein, daß sich die Anteile der möglicherweise vorhandenen verschiedenen genetischen Veränderungen, die zur

---

1) Wie wenig sich aus derartigen "Eintrefferkurven" über den Mechanismus der Strahlenwirkung aussagen läßt, zeigte z.B. WÜRGLER 1963, der nachweisen konnte, daß sich für die Abtötung von Drosophila-Eiern, wenn man Eier verschiedener Altersstufen gemeinsam zur Untersuchung heranzieht, lineare Inaktivierungskurven ergeben, während die Inaktivierungskurven für Eier aus kleineren Zeiträumen nach der Eiablage nichtlinear sind. Ähnliche Zusammenhänge gelten auch für die Auslösung von Mutationen unter gleichen experimentellen Bedingungen (WÜRGLER, pers. Mitteilung).

Prototrophie führen, in Abhängigkeit von Ploidiegrad und Dosis verschieben.

Für die Serin-bedürftigen Stamme ergeben sich ebenfalls nichtlineare Mutationsraten-Dosiskurven (Abb. 20). In diesem System ist die Aussagekraft der Kurve für den Haplonten gering, da für diesen Stamm die beobachteten Mutantenzahlen so gering waren, daß die dargestellte Kurve nur die obere Schranke der Mutationsraten angibt. Vergleicht man die Di-, Tri- und Tetraplonten untereinander, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Dosisabhängigkeit der Mutationsraten.

Diese einheitlichere Kinetik, gemeinsam mit den gegenüber den IV-bedürftigen Stammen um ca. eine Zehnerpotenz geringeren Mutationsraten, läßt ~~sich~~ vermuten, daß es sich bei dieser "Rückmutation" möglicherweise um bevorzugt einen einzigen Typ von genetischen Veränderungen handelt. Diese Annahme wird noch gestützt durch die Beobachtung, daß in den auf die erste Zählung folgenden 8 Tagen bei allen Se-bedürftigen Stammen sehr zahlreiche, nicht echt prototrophe Mutanten auf dem Mangelmedium nachwachsen. Dadurch wird zwar die Bestimmung der Mutationsraten etwas beeinflußt, da der Zeitpunkt der ersten Zählung kleinen Schwankungen unterlag, es wird jedoch die Klasse der schwach prototrophen Mutanten weitgehend abgetrennt und unberücksichtigt gelassen.

Bei der Untersuchung des Einflusses von genetischen Veränderungen, die Veränderungen der Röntgeninaktivierungskurven ergeben, auf die Mutabilität zeigte sich sowohl für den aa-Effekt als auch für den AS-Effekt keine Korrelation zwischen Inaktivierung und Mutabilität[1]. - Inwieweit die schwache Korrelation zwischen der gegenüber dem Stamm 211-1aM erhöhten Röntgenresistenz bezüglich Inaktivierung und

---

[1] In HAFFNER [1964] wurde aus vorläufigen Ergebnissen in einem Dosisbereich bis 9 krad der Schluß gezogen, daß der aa-Effekt auf die "Rückmutationen" nur IV-Prototrophie wirkt. Diese Aussage erwies sich jedoch als nicht aufrechtzuerhalten, nachdem die Untersuchungen der Mutabilität der verschiedenen Diplonten auf Dosen bis zu 25 krad ausgedehnt wurden.

Mutabilität des Stammes 230-1c ein Indiz für die gleichartige Wirkung genetischer Veränderungen ist, muß dahingestellt bleiben, da dieser Stamm sich auch in anderen Eigenschaften, wie Wachstumsgeschwindigkeit von 211-1aM unterscheidet.

Die Mutation zur Adenin-Prototrophie in dem haploiden Stamm R 154 ergab eine Erhöhung der "Rückmutationsrate" zur Histidin-Prototrophie, jedoch keine Veränderung der Überlebenswahrscheinlichkeit. - MOUSTACCHI und MARCOVICH 1962 fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen Mutabilität und Inaktivierung. Die von ihnen gefundene, die Inaktivierung der Haplonten stark senkende Mutation S^+ wirkte nicht auf die "Rückmutationen" von der Histidin-Auxotrophie zur Prototrophie.

Dieser Mangel einer eindeutigen Korrelation zwischen Mutabilität und Inaktivierung läßt die Vermutung zu, daß Inaktivierung und Mutationen der untersuchten Art sowohl in haploiden als auch in diploiden Saccharomyces-Stämmen deswegen nicht korreliert sind, weil sie bei möglicherweise gleichen Primärereignissen auf unterschiedliche Zellstrukturänderungen zurückgehen. Unterstellt man, daß genetisch nachgewiesene rezessive Letalmutationen - von denen man gerade nach den Untersuchungen von de SERRES 1963 u. 1964 an Letalmutationen in Neurospora crassa annehmen kann, daß sie den beobachteten "Rückmutationen" strukturell am ähnlichsten sind -, für die Inaktivierung von haploiden Stämmen nur einen kleinen Betrag liefern (MORTIMER 1961), so wäre zu verstehen, daß auch im Haplonten Genomveränderungen, die auf die Mutabilität bestimmter Gene wirken, keinen erkennbaren Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit haben. - Ähnliche Überlegungen gelten auch für die diploiden Stämme, deren Inaktivierung möglicherweise bevorzugt auf Chromosomenanomalien und Mitosestörungen zurückzuführen ist und daher in anderer Weise beeinflußt wird wie die Auslösung von Punktmutationen.

Von besonderem Interesse ist die Ploidiegradabhängigkeit der untersuchten "Rückmutationen". Tab. 5 gibt einen Überblick über das Verhältnis der Mutationsraten der Stämme der Ploidiegrade p bezogen auf die mittleren Mutationsraten der zugehörigen Diplonten für die "Rückmutationen" zur IV-Prototrophie. Für die "Rückmutation" zur Se-Prototrophie ergibt sich, wie Abb. 20 erkennen läßt, kein signifikanter Unterschied zwischen p = 2, 3 und 4. Über p = 1 kann wegen der Unsicherheit der Kurve für den Haplonten nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche Beziehung zu p = 2, 3, 4 besteht.

"Rückmutation"	Dosis [kr]	"Rückmutationsrate", in () m_p/m_2			
		m_1	m_2	m_3	m_4
iv → IV	10	$1{,}8 \cdot 10^{-7}$ (0,5)	$3{,}4 \cdot 10^{-7}$	$3{,}2 \cdot 10^{-7}$ (0,9)	$3{,}1 \cdot 10^{-7}$ (0,9)
	20	$4{,}1 \cdot 10^{-7}$ (0,6)	$6{,}5 \cdot 10^{-7}$	$4{,}2 \cdot 10^{-7}$ (0,6)	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$ (0,8)
	50	-	$2{,}0 \cdot 10^{-6}$	$1{,}4 \cdot 10^{-6}$ (0,7)	$1{,}4 \cdot 10^{-6}$ (0,7)
	100	-	$4{,}0 \cdot 10^{-6}$	$4{,}0 \cdot 10^{-6}$ (1,0)	$4{,}5 \cdot 10^{-6}$ (1,1)
	200	-	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$	$1{,}8 \cdot 10^{-5}$ (3,0)	$4{,}5 \cdot 10^{-5}$ (7,5)

Tab. 5

Rö-induzierte "Rückmutationsraten" als Funktion von Dosis und Ploidiegrad für die "Rückmutation" zur IV-Prototrophie.

Der Quotient m_p/m_2 erscheint für die Beurteilung der Ploigradabhängigkeit besser geeignet als m_p/m_1, da m_2 für alle Dosen bekannt ist. Die Werte wurden Abb. 16 entnommen.

Vergleicht man die Mutationsraten von Haplonten mit denen der Diplonten, so erhält man für Röntgenstrahlen eine angenäherte Konstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz, wenn man die Mutationsraten der Mutation zur IV- und Histidin-Prototrophie (Abb. 21) betrachtet. Die Ergebnisse der Serin-bedürftigen Stämme müssen nicht gegen eine derartige Abhängigkeit sprechen. - Diese Befunde unterscheiden sich von den von ARMAN u. ARDASCHNIKOW 1964 mitgeteilten Ergebnissen. Diese Autoren fanden einen Anstieg der γ-Strahlen-induzierten "Rückmutationsraten", wenn sie einen diploiden Stamm mit zwei aus diesem entstandenen haploiden Segregantenstämmen verglichen (untersuchte Mutation von der Histidin-Auxotrophie zur Histidin-Prototrophie). Die beobachtete starke Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz ist möglicherweise durch Heterozygotien in den verwandten Diplonten und daraus folgenden Anisogenien der verglichenen Stämme zu erklären[1]. Daß Anisogenien zu starken Verschiebungen der Ploidiegradabhängigkeit von Mutationsraten führen können, zeigt ein Vergleich der Mutationsraten der Stämme R 154a und R 154/2 (Abb. 3 u. 21). Bezüglich der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" in Tri- und Tetraplonten ist es nicht möglich, aus dem vorliegenden Material allgemeine Schlüsse zu ziehen, da für die Mutation zur IV-Prototrophie die Mutationsraten vom Tri- zum Tetraplonten bei höheren Dosen ansteigen, während sie bei den Serin-bedürftigen Stämmen schwach abnehmen. - Zieht man als Vergleichsstämme noch die Diplonten heran, so fällt auf, daß die Mutationsraten der IV-bedürftigen Diplonten bei kleineren Dosen zwar um den Faktor 2 über denen des Haplonten, aber nicht um den Faktor 1,5 bzw. 2 unter denen der Tri- bzw. Tetraplonten liegen. Ähnliches gilt auch für die Serin-bedürftigen Stämme, wo die Mutationsraten der Diplonten mit denen der Tri- und Tetraplonten zusammenfallen.

---

1) Über die genetische Struktur der Stämme enthält die Arbeit keine ausreichende Information.

Dieser Gang der Mutationsraten könnte erklärt werden durch ein "Sichnichtdurchsetzen" (Semidominanz) eines Teils der primär entstandenen Mutationen zur Prototrophie in Tri- und Tetraplonten. Um dies zu prüfen, wurden 16 mit 20 kr induzierte haploide, IV-prototrophe "Rückmutanten" des Stammes 211-1aM mit diploiden Zellen des Stammes 230-1c/2 (IV-auxotroph) gekreuzt, und die aus der mikromanipulatorischen Isolation von jeweils drei triploiden Zygoten resultierende Stämme auf ihre IV-Bedürftigkeit durch Stempel auf W-Se-Medium überprüft. 14 Stämme erwiesen sich als prototroph, 2 waren auxotroph. Bei einer in gleicher Weise durchgeführten Kreuzung der gleichen Haplonten mit dem IV-auxotrophen Haplonten 230-1c erwiesen sich alle diploiden Zygoten als IV-prototroph. Dieses Ergebnis zeigt, daß zwar Fälle von Semidominanz in Stämmen höheren Ploidiegrades auftreten, sie können jedoch quantitativ den fehlenden Anstieg der Mutationsraten vom Diplonten zum Tetraplonten nicht erklären. Falls nämlich nur die Semidominanz die Ursache der Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz ist, hätten ca. 90 % der "Rückmutanten" auxotrophe triploide Zygoten bilden müssen (siehe dazu auch 3.1.3.2.).

Ein größerer Einfluß von rezessiven Suppressoren für die "Rückmutation" zur IV-Prototrophie ist recht unwahrscheinlich, da vom Haplonten zum Diplonten der plausible Anstieg um den Faktor 2 vorliegt. Denkbar wäre daher eine Beteiligung rezessiver Suppressoren nur dann, wenn man gleichzeitig annimmt, daß die Raten, mit denen dominante Mutationen auftreten, vom Haplonten zum Diplonten um einen wesentlich über dem Faktor 2 liegenden Wert ansteigen. Gegen rezessive "Rückmutationen" sprechen vor allem die oben angeführten Kreuzungen der "Rückmutanten" mit dem Stamm 230-1c.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit einigen Resultaten über die Konstanz von Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz in Pflanzen verschiedenen Ploidiegrades, für die sehr heterogene Ergebnisse bekannt sind (Zusammenfassung siehe z.B. bei BHASKARAN und SWAMINATHAN 1962 und

Mc KEY 1954) erscheint wegen der großen systematischen und methodischen Unterschiede nicht sinnvoll.
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das vorliegende Material nicht gegen eine Konstanz der Röntgen-induzierten Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz in fast isogenen und homozygoten Haplonten und Diplonten spricht.
Zieht man jedoch auch Stämme höherer Ploidieklassen zum Vergleich heran, so ergeben sich für die untersuchten "Rückmutationen" Abweichungen von dieser Konstanz. Inwieweit diese Abweichungen durch eine primäre Inkonstanz der Entstehung von Röntgen-induzierten Veränderungen oder durch Fragen der phänotypischen Nichtausprägung von Mutationen bedingt sind, konnte aufgrund des vorliegenden Materials nicht geklärt werden. (Bezüglich eines Einflusses des mitotischen crossover siehe 3.3.).

3.1.3. Die UV-induzierte Mutabilität in einem System fast homozygoter und isogener Saccharomyces-Stämme

Die Untersuchung von UV-induzierten "Rückmutationsraten" bei Saccharomyces erfordert wegen der Kleinheit der Zellen stets Bestrahlungen in dichten Suspensionen. In diesen ist die am Ort der Zelle wirksame UV-Dosis abhängig vom Volumen und damit vom Ploidiegrad der bestrahlten Zellen. Dieser experimentell wichtige Einfluß wurde durch Ermittlung der "wirksamen Dosis" (siehe 2.2.1.) für alle in folgenden angegebenen Dosisabhängigkeiten berücksichtigt.
Die Untersuchung der "Rückmutationsraten" im Se-bedürftigen Stammsystem war für UV nicht möglich, da neben echt prototrophen großen Kolonien bereits bei der ersten Zählung zahlreiche kleine Kolonien auf den Mangelplatten vorhanden waren, deren Wachstum nicht dem prototropher "Rückmutanten" entsprach, und die eine quantitative Auswertung unmöglich machten.

3.1.3.1. Ergebnisse

Für die UV-induzierte Mutabilität wurde nur der Einfluß der Paarungstypallelkonstitution von Diplonten als Beispiel für die Auswirkung von Heterozygotien auf Mutationsraten geprüft (Abb. 22). Die ermittelten Raten für aα- und αα-Diplonten sind nicht signifikant getrennt. Die Paarungstypkonstitution hat also bei UV-Bestrahlungen keinen Einfluß sowohl auf Inaktivierung als auch auf Mutabilität.

Die Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" für die Mutationen zur IV-Prototrophie wurde in Versuchen ermittelt, die parallel zu den Röntgenversuchen liefen. Die Ergebnisse zeigen die Abb. 23, 24 und 25 für die haploiden, tri- und tetraploiden Stämme. In Abb. 26 sind die "besten" Kurven aus den Abb. 22, 23,24 u. 25 zusammengetragen[1].

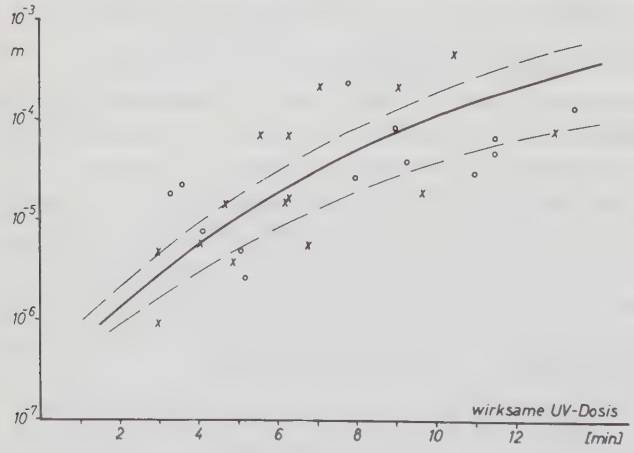


Abb. 22
UV-induzierte "Rückmutationsraten" für zwei fast isogene und homozygote Diplonten unterschiedlicher Paarungstypkonstitution für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie. 230 (αa) = o; 211-1aM/2 (αα) = x .

1) Die UV-Inaktivierungskurven der betreffenden Stämme finden sich in Abb. 1.

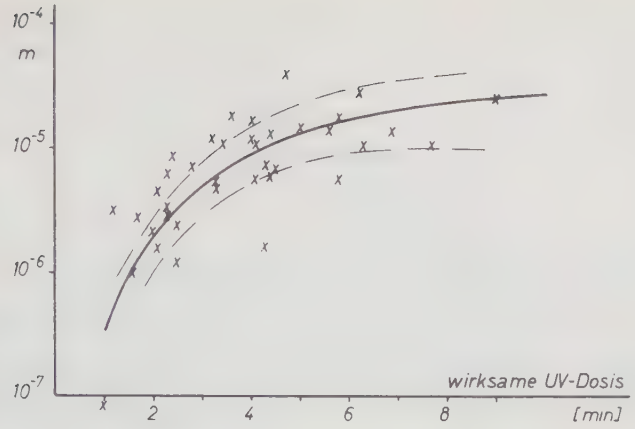


Abb. 23
UV-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für den haploiden Stamm 211-1aM.

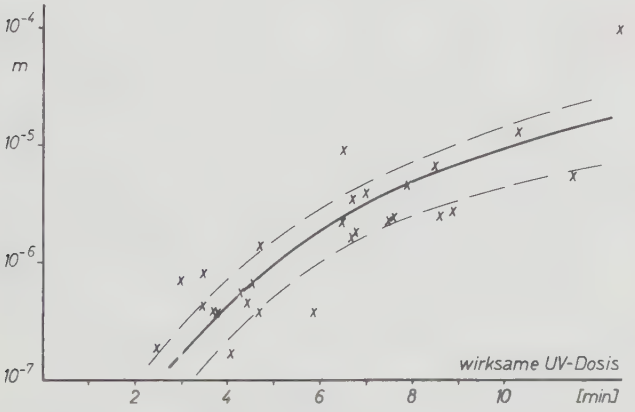


Abb. 24
UV-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für den triploiden Stamm 301.

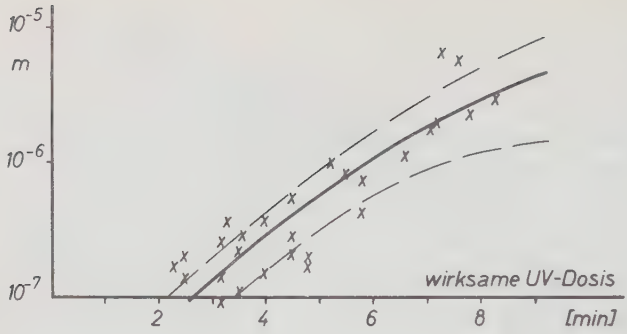


Abb. 25
UV-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für den tetraploiden Stamm 401.

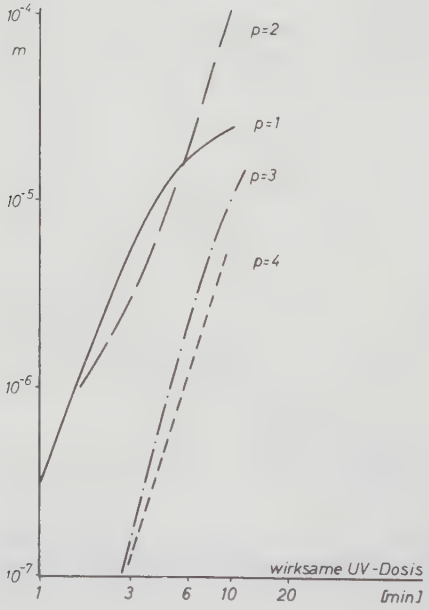


Abb. 26
UV-induzierte "Rückmutationsraten" für die Mutation von der IV-Auxotrophie zur Prototrophie für eine Serie fast homozygoter und isogener Stämme der Ploidieklassen p = 1 bis 4.

Eine Untersuchung der "Rückmutanten"-Kolonien auf echte Prototrophie (Wachstumstest in flüssigem W-IV-Se-Medium) ergab, daß mindestens 90 % aller gezählten Kolonien echt prototroph waren. 10 % zeigen, vor allem, wenn sie aus Bestrahlungen mit hohen Dosen stammen, ein schlechtes oder gar kein Wachstum in diesem Medium.
Die aus Abb. 26 ersichtliche große Inkonstanz der "Rückmutationsrate" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz läßt eine Reihe von unterschiedlichen Erklärungen zu, die in 3.1.3.3. gemeinsam besprochen werden sollen. Zu dieser Diskussion war eine genauere Untersuchung der UV-induzierten "Rückmutanten" nötig, deren Ergebnis deshalb im folgenden vorweg mitgeteilt werden soll.

3.1.3.2. Genetische Untersuchung haploider, prototropher UV-induzierter Mutanten

Die starke Abnahme der UV-induzierten "Rückmutationsraten" zur IV-Prototrophie von p = 1 zu p = 3 und 4 läßt zuerst auf eine größere Beteiligung rezessiver Suppressoren schließen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden zahlreiche nach Applikation verschiedener Dosen aufgewachsene haploide "Rückmutanten" des Stammes 211-1aM mit Zellen des IV-auxotrophen haploiden Stammes 230-1c zur Kopulation gebracht und die aus jeweils 3 Zygoten aufwachsenden Kulturen durch Stempeln auf W-IV-Se-Medium auf ihre IV-Bedürftigkeit geprüft. Falls prototrophe "Rückmutanten" durch Mutation rezessiv wirkender Suppressoren (S→s) entstehen, sollte für diese Kreuzungen folgende genetische Situation vorliegen:

"Rückmutante"	x	230-1c	ergibt	Zygote
iv s	x	iv S		iviv sS

Die diploiden Zygoten müßten also phänotypisch IV-bedürftig sein. In Tab. 6 sind die Ergebnisse derartiger Kreuzungen zusammengestellt. Man erkennt, daß keine bzw., wenn man die wenigen schwach prototrophen selbst als falsch klassi-

Wirksame UV-Dosis [min]	Zahl der untersuchten haploiden IV-prototrophen "Rückmutanten"	Zahl der diploiden Kreuzungsprodukte mit folgendem Phänotyp:		
		IV-prototroph	IV-auxotroph	schwach IV-prototroph
2,2	15	14	0	1
3,9	15	13	0	2
6,3	5	5	0	0

Tab. 6 Überprüfung IV-prototropher haploider "Rückmutanten" auf rezessive Suppressoren.

Die wirksame Dosis gibt die Dosis an mit der die "Rückmutanten" induziert wurden. - Die Kreuzungsprodukte entstanden durch Kreuzung mit dem haploiden, IV-auxotrophen Stamm 230-1c. Die Bedürftigkeiten wurden durch Stempeln auf W-IV-Se-Medium ermittelt.

---

fizierte auxotrophe Stämme ansieht, nur höchstens 10 % rezessive Suppressoren möglich sind.

Wie für die Röntgenstrahlen-induzierten haploiden "Rückmutanten" wurde auch das Dominanzverhalten zahlreicher UV-induzierter "Rückmutationen", die durch Bestrahlung des Stammes 211-1aM entstanden waren, im triploiden Genom getestet. Dazu wurden jeweils 3 triploide Zygoten aus Kreuzungen der Haplonten mit dem Stamm 230-1c/2 (IV-auxotroph) mikromanipulatorisch isoliert und durch Stempeln der daraus aufgewachsenen Kolonien auf W-IV-Se-Medium auf ihre Bedürftigkeit hin untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tab. 7 in den Spalten 2, 3, 4 und 5. Im Gegensatz zu den Kreuzungen der gleichen Stämme mit dem Haplonten 230-1c und den entsprechenden Kreuzungen Röntgen-induzierter "Rückmutanten" sind zahlreiche der in Haplonten durch UV-induzierte "Rückmutationen" nicht in der Lage, die IV-Prototrophie in Triplonten zu bewirken[1].

---

1) Eine Untersuchung des gleichen Problems im tetraploiden Genom ist bisher nicht möglich, da kein für das Paarungstyp-allel homozygoter, IV-auxotropher und zu 211-1aM fast isogener Triplont zur Verfügung steht.

Wirksame UV-Dosis [min]	Zahl der untersuchten prototrophen haploiden "Rückmutanten"	Zahl der triploiden Kreuzungsprodukte mit folgendem Phänotyp			$\left(\frac{m_3}{m_1}\right)' = 3\left(1-\frac{a}{a+p}\right)$	$\frac{m_3}{m_1}$
		IV-prototroph (p)	IV-auxotroph	schwach IV-prototroph (a)		
2,2	15	2	7	6	0,41	0,035
3,9	17	2	13	2	0,36	0,045
6,3	14	0	14	0	-	0,12

Tab. 7 Überprüfung IV-prototropher haploider "Rückmutanten" auf "Semidominanz"

Die wirksame Dosis gibt die Dosis an mit der die "Rückmutanten" induziert wurden. - Die Kreuzungsprodukte entstanden durch Kreuzungen der haploiden IV-prototrophen "Rückmutanten" mit dem Stamm 230-1c/2. Die Bedürftigkeiten wurden durch Stempeln auf W-IV-Se-Medium ermittelt. Der größte Teil der untersuchten "Rückmutanten" ist mit den für Tab. 6 benutzten identisch.

Es ergibt sich also vom Diplonten zum Triplonten ein Dominanzwechsel.

Eine genauere Untersuchung dieses Dominanzwechsels steht noch aus. Sie wird besonders durch die schlechte Sporulationsfähigkeit der fast homozygoten und isogenen triploiden Kreuzungsprodukte erschwert. Ebenfalls ungeklärt bleibt auch die Beobachtung, daß in einigen, in Tab. 7 nicht berücksichtigten Fällen aus einer Kreuzung z.B. zwei triploide Kreuzungsprodukte prototroph und ein Kreuzungsprodukt auxotroph waren[1].

Einige UV-induzierte IV-prototrophe "Rückmutanten" wurden einer Analyse unterzogen, inwieweit die "Rückmutationen" außerhalb des die IV-Auxotrophie bedingenden Gens liegen. Dies läßt sich ermitteln, wenn man die "Rückmutanten" mit

---

1) Daß es sich in diesen Fällen um wirklich triploide Kreuzungsprodukte handelt, ergab sich aus der nicht vorhandenen Kopulation dieser Stämme mit α- und a-Teststämmen.

einem IV-prototrophen Stamm kreuzt und anschließend in Tetradenanalysen die Aufspaltung von IV-auxotroph zu IV-prototroph auswertet. Ist der Ort der "Rückmutation" identisch oder eng gekoppelt mit dem Locus, der die Bedürftigkeit ergibt, so sollten innerhalb eines Ascus stets nur prototrophe Ascosporen auftreten, während bei ungekoppelten "Rückmutationen" auch auxotrophe Sporen auftreten müßten. Von 7 nach Bestrahlung mit 2,2 min wirksamer UV-Dosen erhaltenen Haplonten, die mit dem Stamm 211-1b (IV-prototroph) zur Kopulation gebracht wurden, ergab keine der aus den diploiden Kreuzungsprodukten erhaltenen Tetraden auxotrophe Sporen; wegen der schlechten Sporulationsfähigkeit wurden pro Stamm nur 10 Asci zerlegt. Bei diesen willkürlich ausgewählten "Rückmutanten" muß es sich um Mutationen im Locus oder in mittelbarer Nähe handeln.

3.1.3.3. Diskussion

Für das vorliegende Stammsystem ist eine Verfälschung der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" durch die vorhandenen Heterozygotien des Paarungstypallels auszuschließen, da die Paarungstypkonstitution nicht auf die Mutationsraten wirkt, wie Abb. 22 zeigt. Inwieweit möglicherweise sonst noch vorhandene Anisogenien oder Heterozygotien eine Rolle spielen, kann nicht beurteilt werden. Derartige Einflüsse müßten jedoch spezifisch und nur auf die UV-induzierte Mutabilität wirken, da ja die zur gleichen Zeit in parallelen Versuchen durchgeführten Bestimmungen der Ploidiegradabhängigkeit röntgeninduzierter "Rückmutationsraten" zu einem plausibleren Bild führen.
Die Dosisabhängigkeit der "Rückmutationsraten" ist für alle untersuchten Stämme nichtlinear, wie dies auch für zahlreiche andere UV-induzierte Mutationen bei Mikroorganismen beobachtet wurde (Zusammenfassung z.B. bei KAPLAN 1959, HAEFNER 1961). - Für die Diskussion der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" ist die unterschiedliche Dosisabhängigkeit der Mutationsraten der Haplonten auf der

einen und der der Tri- und Tetraplonten auf der anderen Seite interessant[1]. Möglicherweise entspricht diesem Unterschied in der Kinetik ein unterschiedlicher Prozeß der Primäreffekte und / oder der Mutationsmanifestierungsprozesse in Haplonten und Polyplonten.
Besonders auffallend ist die in Abb. 26 erkennbare Abweichung von einer Konstanz der "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz. So ist z.B. die Rate des Haplonten bei der wirksamen Dosis 4 min ca. 30mal größer als die des Tetraplonten, d.h. daß im Tetraplonten die Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz um den Faktor 120 kleiner als im Haplonten ist. - Über die Beziehung der Mutationsraten des Haplonten und der Diplonten läßt sich nur schwer etwas Einheitliches sagen, da die Werte für die Diplonten stark schwanken und teilweise über und teilweise unter denen des Haplonten liegen.
Vergleicht man die hier beobachtete Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" für Haplonten und Diplonten mit der von ARMAN u. ARDASCHNIKOW 1964 mitgeteilten, so ergeben sich gewisse Ähnlichkeiten. Für kleine wirksame Dosen sind bei diesen Autoren Haplonten und Diplont ungefähr gleich mutabel, bei größeren Dosen liegen die Mutationsraten für die "Rückmutation" zur Histidin-Prototrophie für den Diplonten unter und für die "Rückmutation" zur Adenin- oder Uracil-Prototrophie über denen der zugehörigen Haplonten.

Für eine Interpretation der großen Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz bieten sich die unter 3.1.1.2. für die Erklärung der Inkonstanz spontaner Mutationsraten zusammengestellten Modelle an, die im folgenden kurz diskutiert werden sollen:
Zu a) Beteiligung rezessiv wirkender Mutationen. Wie in 3.1.3.2. Tab. 6 dargelegt, können rezessive Mutationen höchstens 10 % der beobachteten "Rückmutationen" ausmachen. Wollte man jedoch den starken Abfall der "Rückmutationsraten" vom Haplonten zum Tetraplonten erklären, so müßte

1) Für die Diplonten ist die Streuung der Meßwerte zu groß, um eine Aussage darüber zu machen, ob ihre Mutationsraten die gleiche Dosisabhängigkeit wie die der Haplonten oder der Polyplonten haben.

bei Konstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz der Anteil rezessiv wirkender Mutationen wesentlich höher sein[1].

Zu b) Phänotypisches Nichtausprägen primär entstandener Mutationen. Die Ergebnisse der in 3.1.3.2. durchgeführten Kreuzungen (Tab. 7) zeigen, daß mit derartigen Einflüssen zu rechnen ist. Es gibt Mutationen, die im Haplonten einen prototrophen, im Triplonten jedoch einen auxotrophen Phänotyp bewirken. Dieser Effekt der Semidominanz reicht jedoch nicht aus, um quantitativ den Gang der Raten vom Haplonten zum Triplonten zu erklären. Setzt man nämlich voraus, daß sich im Triplonten von den durch die Bestrahlung entstehenden Mutationen genauso viel phänotypisch als prototroph ausprägen wie bei den Kreuzungen zwischen prototrophen, haploiden "Rückmutanten" und dem Stamm 211-1c/2, so kann man abschätzen, inwieweit sich der Abfall der "Rückmutationsraten" vom Haplonten zum Triplonten durch die Semidominanz erklären läßt.
Um eine für die Erklärung der Ploidiegradabhängigkeit durch Semidominanz recht günstige Abschätzung zu machen, soll angenommen werden, daß auch die in Tab. 7 als schwach prototroph klassifizierten triploiden Kreuzungsprodukte auxotroph sind. Dann müßte sich das unter Berücksichtigung phänotypischen Nichtausprägens von Mutationen zu erwartende Verhältnis der "Rückmutationsraten" bei Konstanz der

---

1) Macht man den einfachen Ansatz, daß die Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz für dominant und rezessiv wirkende Mutationen (r und d) unabhängig vom Ploidiegrad sind, so ergibt sich für die "Rückmutationsrate" in einem Stamm des Ploidiegrades p bei kleinen d:

$$m_p = r^p + pd, \quad \text{für } p = 1 \text{ bis } 4.$$

Dies sind vier Gleichungen mit zwei Unbekannten, also überbestimmt für r und d. Für die in Abb. 26 dargestellten Mutationsraten läßt sich jedoch keine Wertekombination von d und r finden, die alle Gleichungen erfüllt. Läßt man die Mutationsraten der Di- und Triplonten unberücksichtigt, so ergibt sich für den Anteil der rezessiven Mutationen (r/r+d) ein Wert von ca. 0,99 bei der wirksamen UV-Dosis 4 min.

Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz zu

$$(20) \qquad \left(\frac{m_3}{m_1}\right)' = 3\left(1 - \frac{a}{a+p}\right)$$

ergeben. Dabei ist a die Zahl der sich in Triplonten nicht ausprägenden, aber in Haplonten prototroph wirkenden Mutationen und p die Zahl der in beiden Genomen die Prototrophie bedingenden Mutationen. Dieses Verhältnis ist aus den Spalten 3, 4 und 5 in Tab. 7 entnommen und in Spalte 6 eingetragen. In Spalte 7 wurde das aus Abb. 26 entnommene Verhältnis m_3/m_1 bei der betreffenden Dosis eingesetzt. Man erkennt, daß $(m_3/m_1)'$ mit steigender Dosis fällt und m_3/m_1 zunimmt. Diese Zunahme geht vor allem auf die Sättigung der Mutationsraten-Dosiskurve für den Haplonten zurück. Für kleinere wirksame Dosen ist m_3/m_1 ca. eine Zehnerpotenz kleiner als $(m_3/m_1)'$.

Das beobachtete phänotypische Nichtausprägen kann also trotz der günstig durchgeführten Abschätzung im Bereich kleiner UV-Dosen nicht zur quantitativen Erklärung der beobachteten Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chomosomensatz herangezogen werden. Bei höheren Dosen scheinen die Raten, mit denen im Haplonten echt dominante Mutationen auftreten, nur noch schwach mit der Dosis anzusteigen, wodurch die Sättigung der Mutationsraten-Dosiskurve des Haplonten, die Zunahme der nicht echt dominant wirkenden Mutationen und möglicherweise die Inkonstanz der "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz zusammenhängen können.

Zu c) Verzögertes Aufwachsen von "Rückmutanten" höheren Ploidiegrades. Gegen diese Erklärung sprechen die aus Koloniezählungen nach 12 - 15 Tagen nach der Bestrahlung ermittelten "Rückmutationsraten". Es ergaben sich für den Haplonten im Mittel über alle UV-Dosen ca. viermal größere Mutationsraten gegenüber der ersten Zählung, während die Raten des Triplonten entgegen dem beim Nachwachsen von Stämmen

höheren Ploidiegrades zu erwartenden größeren Zuwachs nur um den Faktor 2 anstiegen.

Zu d) Primäre Inkonstanz der "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz in Stämmen verschiedenen Ploidiegrades. Die unter a) - c) diskutierten Modelle reichen zumindestens bei kleinen und mittleren UV-Dosen nicht aus, die starke Abweichung von einer Konstanz der "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz zu erklären. Es erscheint daher nicht ausgeschlossen, daß es sich tatsächlich um eine primäre Inkonstanz handelt, wenn nicht weitere noch unbekannte Vorgänge zu einer Reduktion der phänotypisch erkennbaren Mutationen in Stämmen höheren Ploidiegrades führen.

Ein derartiger Mechanismus ist der Verlust von Genen durch das nach Bestrahlung stark erhöhte "mitotische crossover". Dieser Prozeß sowie sein möglicher Einfluß auf die UV-induzierten Mutationsraten wird genauer in 3.3.3. besprochen. Hier sei vorweggenommen, daß dieser Einfluß zwar ebenfalls zu einer Reduktion strahleninduzierter "Rückmutationsraten" führt, aber größenordnungsmäßig zu klein ist, um die beobachtete starke Inkonstanz zu erklären.

Um weitere Argumente für oder gegen eine primäre Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz bzw. der zugehörigen strahlenchemischen Primärprozesse zu erhalten, wurde geprüft, ob Stämme der Ploidieklassen p = 1 und 4 unterschiedlich auf Behandlungen nach UV-Bestrahlung reagieren. - Bei unmittelbar nach der Bestrahlung nach verschiedenen Dosen über Zeiträume von maximal 6 Std. durchgeführten Bebrütungen der bestrahlten Zellen in YPf-Medium zeigten die Stämme 211-1aM und 401 keine Veränderung der UV-induzierten "Rückmutationsraten" und der Überlebenswahrscheinlichkeit[1]. - Werden die gleichen Stämme unmittelbar nach der UV-Bestrahlung mit langwelligem Licht bestrahlt,

---

1) Für die UV-Inaktivierung ist bekannt, daß Stehenlassen in destilliertem Wasser über längere Zeiträume sowohl im Haplonten als auch im Polyplonten zu einer Reaktivierung führt (PATRICK, HAYNES, URETZ 1962).

so erhält man für die beiden sowohl Photoreaktivierung als auch Photoreversion (Abb. 27 und 28). Ein Vergleich der Dosisreduktionsfaktoren für die Photoreversion im haploiden und tetraploiden Stamm ergibt jedoch keine signifikanten Unterschiede.
Diese bezüglich der beiden Stämme nicht selektive Wirkung der Nachbehandlungen muß nicht gegen eine primäre Inkonstanz der "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz sprechen, da es denkbar ist, daß zwar in Stämmen verschiedenen Ploidiegrades pro Zelleinheit UV-induzierte Primärprozesse mit unterschiedlicher Häufigkeit entstehen, aber dann in gleicher Weise beeinflußbar sind. Ein mögliches Indiz für eine Inkonstanz wäre nur eine unterschiedliche Beeinflußbarkeit der Mutationsraten für den Haplonten und Tetraplonten.
Aneuploidien der Stämme als Ursache der unerwarteten Ploidiegradabhängigkeit scheiden, wie bereits in 3.1.1.2. diskutiert, und im Hinblick auf die plausiblen Ergebnisse nach Röntgenbestrahlung, aus.
Zusammenfassend ist festzustellen, daß zwar einige Mechanismen gefunden wurden, die eine Erniedrigung UV-induzierter "Rückmutationsraten" in Stämmen höheren Ploidiegrades ergeben, deren Anteil jedoch zu gering für eine quantitative Erklärung der Inkonstanz der Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz ist. Es muß daher aus dem vorliegenden Material gefolgert werden, daß entweder noch weitere Mechanismen zu einer Reduktion der Zahl der Mutanten in Stämmen höheren Ploidiegrades führen, oder daß die Raten pro Gen bzw. pro Chromosom, mit denen Mutanten durch UV induziert werden, selbst in fast isogenen und homozygoten Saccharomyces-Stämmen vom Ploidiegrad abhängen.

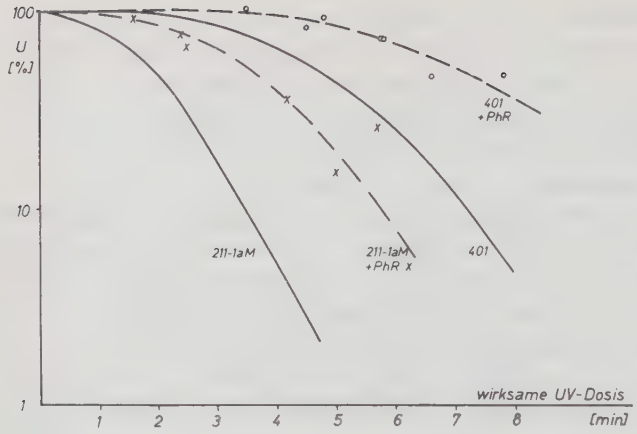


Abb.27

UV-Inaktivierung und maximale Photoreaktivierung für den haploiden Stamm 211-1aM und den Tetraplonten 401

Die maximale Photoreaktivierung wurde aus der Sättigung der Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit als Funktion der eingestrahlten Dosis langwelligen Lichtes ermittelt.

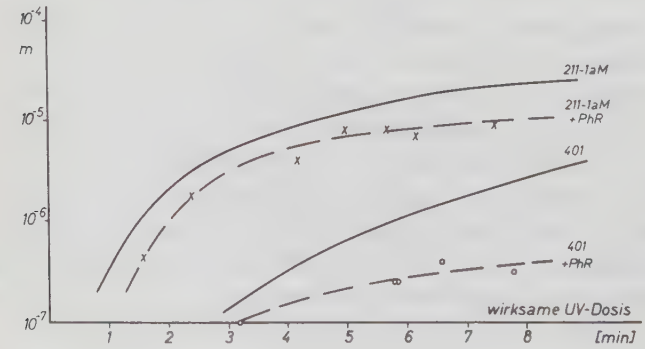


Abb. 28

UV-induzierte "Rückmutationsraten" und maximale Photoreversion für den haploiden Stamm 211-1aM und den Tetraplonten 401.

3.2. Zur Induktion rezessiv letal wirkender Mutationen in "haploiden" und diploiden Saccharomyces-Stämmen

Die von STEIN und LASKOWSKI vorgeschlagene Deutung der Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung von Saccharomyces führt u.a., wie in 1. dargelegt, zu der Folgerung, daß die Inaktivierung der Haplonten bevorzugt durch rezessiv letal wirkende Gene verursacht wird, während MAGNI 1959 und MORTIMER 1961 aus ihren Experimenten schlußfolgerten, daß keine ausreichende Zahl derartiger Mutationen nach Bestrahlung auftritt.
Es erscheint daher interessant, zur Klärung folgender Fragen mit der von diesen Autoren entwickelten Technik Experimente auszuführen:
a) In welchem Maße gibt es neben den eine normale Segregation zeigenden rezessiven Letalfaktoren andere anomal segregierende und quasi rezessiv letal wirkende genetische Veränderungen? b) In welcher Weise sind die Raten, mit denen rezessiv letal wirkende Genzustände auftreten, von dem Ploidiegrad der bestrahlten Zellen abhängig? Und c) wieweit wird die Nachweisbarkeit von derartigen Genzuständen von den physiologischen Bedingungen zwischen Bestrahlung und der zum Nachweis der rezessiven Letalfaktoren in Haplonten nötigen Kopulation beeinflußt?

3.2.1. Ergebnisse

Tetradenanalysen von Kulturen des Stammes H 168 ergeben nach Röntgenbestrahlung die in Tab. 8 zusammengefaßten Ergebnisse (Technik siehe 2.3.4.2.). Werden die durch Kreuzung den Stamm H 168 bildenden Haplonten A 103 und A 106 jeweils einzeln mit Röntgenstrahlen bestrahlt, und wird nach erfolgter Kopulation eine Tetradenanalyse der resultierenden diploiden Kulturen durchgeführt, so ergeben sich die Werte der Tab. 9. Wurde nur der eine Haplont (A 106) bestrahlt, so erhält man die Werte der Tab. 10.
Aus diesen drei Tabellen lassen sich gemäß 2.3.4.1. die Anteile der von rezessiv letal wirkenden Zuständen freien Kulturen bestimmen. Entsprechend den Kontroll-Tetradenana-

Nr. der untersuchten Kultur	Zahl der Asci mit einer Auspaltung von vital : letal von				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
H 168-C_2	9	0	0	0	0
C_3	0	0	10	0	0
C_4	10	0	0	0	0
C_5	9	0	0	0	1
C_6	7	0	0	0	2
C_7	9	1	0	0	0
C_8	10	0	0	0	0
C_9	9	1	0	0	0
C_{10}	8	2	0	0	0
C_{11}	6	1	3	0	0
C_{12}	10	0	0	0	0
C_{13}	7	3	0	0	0
C_{14}	0	0	3	7	0
C_{15}	8	1	1	0	0
C_{16}	0	0	8	1	0
C_{17}	0	0	8	2	0
C_{18}	0	0	8	2	0
C_{20}	6	1	0	0	3

Tab. 8 Aufspaltung der Sporen von 19 nach Bestrahlung mit 50 kr aus dem Stamm H 168 resultierenden Kulturen

Als letal wurden alle die Sporen gewertet, die entweder im Einzelstadium liegenblieben oder höchstens gerade noch sichtbare Mikrokolonien bildeten. Abimpfungen derartiger Mikrokolonien erweisen sich im YPf-Medium im allgemeinen als nicht vital.

Die Ergebnisse dieser Tab. entstammen Untersuchungen, die gemeinsam mit Dr. LASKOWSKI durchgeführt wurden.

Nr. des untersuchten Kreuzungsproduktes	Zahl der Asci mit einer Aufspaltung von vital : letal[1] von				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
H 168 - 96	9	1	0	0	0
98	0	0	5	0	0
100	9	1	0	0	0
102	10	0	0	0	0
104	0	1	8	0	1
105	10	0	0	0	0
106	8	2	0	0	0
107	1	1	6	2	0
108	9	1	0	0	0
110	9	1	1	0	0

Tab. 9 Aufspaltung der Sporen von 10 durch Kreuzung in Massentechnik aus den Stämmen A 106 und A 103 nach Bestrahlung mit 40 kr resultierenden Diplonten.

Nr. des untersuchten Kreuzungsproduktes	Zahl der Asci mit einer Aufspaltung von vital : letal[1] von				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
H 168-81	0	3	5	4	8
82	16	3	1	0	0
83	0	2	6	5	7
84	10	7	1	2	0
85	20	0	0	0	0
86	14	3	1	0	2
87	0	2	1	3	4
89	6	2	1	1	0
90	0	1	8	1	0
91	9	5	5	0	1
93	8	4	4	3	1
94	0	1	1	2	6
95	16	9	5	0	0

Tab. 10 Aufspaltung der Sporen von 13 durch Kreuzung in Massentechnik aus dem unbestrahlten Stamm A 103 und dem mit 40 kr bestrahlten Haplonten A 106 entstandenen Kulturen.

---

1) Als letal wurden alle die Sporen gewertet, die entweder im Einzelstadium liegenblieben oder höchstens gerade noch sichtbare Mikrokolonien bildeten. Abimpfungen derartiger Mikrokolonien erweisen sich in YPf-Medium im allgemeinen als nicht vital.

lysen von unbestrahlten Zellen des Stammes H 168, die eine sehr geringe Sporenletalität zeigen, sollen hier alle die Kulturen bzw. Kreuzungsprodukte als vital gewertet werden, die - unabhängig von der Aufspaltung - weniger als 5 % letale Sporen aufweisen[1].
Wird der Diplont H 168 direkt bestrahlt, so ergibt sich

$$M_2 = 7/19 \approx 0,4 \qquad \text{(Dosis 50 kr)}.$$

Werden die den Stamm H 168 nach Kopulation bildenden Haplonten einzeln bestrahlt, so erhält man

$$M_{11} = 6/10 = 0,6 \qquad \text{(Dosis 40 kr)}.$$

Wird nur einer der Haplonten bestrahlt, so ist

$$M_1 = 1/13 \approx 0,08 \qquad \text{(Dosis 40 kr)}.$$

Im Gegensatz zur Erwartung nimmt der Anteil der von rezessiv letal wirkenden Zuständen freien Kulturen ab, wenn nur ein Haplont bestrahlt wird (siehe dazu 3.2.2.). - Wichtig ist, daß in allen drei Tabellen Segregationen auftreten, die sich nicht durch die Annahme einer Segregation einzelner oder mehrerer "klassischer" Letalfaktoren erklären lassen (siehe dazu z.B. die Kulturen H 168-107, H 168-C_{20} und H 168-93).
Mit der individuellen Technik (siehe 2.3.4.2.) wurde geprüft, inwieweit das Auftreten letaler Sporen von der Behandlung zwischen Bestrahlung und Kopulation abhängt. Es ergab sich für die Kreuzungsprodukte der Stämme 211-1aM und 211-1bN keine erkennbare Veränderung des Wertes M_{11}, wenn zwischen Bestrahlung mit 40 bzw. 50 kr und der Kopulation eine maximal 10-stündige Bebrütung auf YP bei 30°C eingeschoben wurde. - Auf eine quantitative Darstellung

---

1) Dieses Kriterium steht nicht in Übereinstimmung mit der von MORTIMER 1961 und MAGNI 1959 gemachten Definition, daß nur die Kulturen letale Zustände enthalten, in denen mindestens 5 Asci zwei oder weniger vitale Sporen pro Ascus liefern (siehe dazu auch 3.2.2.).

dieser Ergebnisse muß zur Zeit verzichtet werden, da sich Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit der zu Anfang der Experimente sehr guten Sporenvitalität des aus der Kreuzung der unbestrahlten Haplonten resultierenden Stammes 2$_{\circlearrowleft}$T1 ergeben haben.

3.2.2. Diskussion

Das in diesem Kapitel vorgelegte Material erlaubt keine breite Diskussion. Die Analyse der rezessiv letalen Wirkungen und speziell die Deutung der komplizierten Aufspaltungsverhältnisse bedarf noch eingehender Untersuchungen. Dennoch ermöglichen die vorliegenden Ergebnisse, einige wichtige Aspekte aufzuweisen:

a) Es gibt neben den - hier seltenen - "klassischen" Letalfaktoren nach Bestrahlung sowohl von Haplonten als auch von Diplonten in im Anschluß an die diploide Phase durchgeführte Tetradenanalysen Aufspaltungen, die nicht durch die Wirkung einzeln letal wirkender Gene zu interpretieren sind. Diese Aufspaltungen können durch die Wirkung polygen letal wirkender Gene, durch Heterogenität der zur Tetradenanalyse benutzten Kulturen, durch nicht 100 %ige Penetranz rezessiv letaler Mutationen oder durch recht unwahrscheinliche nichtchromosomale Effekte erklärt werden[1]. Daß es nach Bestrahlung zu einer Segrgation letal wirkender Zustände kommen kann, zeigen die in 3.4. dargelegten Ergebnisse. Derartige Segregationen könnten auch zu einer bezüglich rezessiver Letalfaktoren heterogenen Kultur und damit zu den beobachteten Aufspaltungen führen. Durch Isolation einzelner Zellen aus diesen Kulturen und deren Tetradenanalyse wäre diese Möglichkeit zu überprüfen; die möglicherweise polygene Wirkung mehrerer jeweils einzeln nicht letal wirkender Gene ließe sich durch Kreuzungsexperimente testen.

b) Die Bestrahlung von diploiden Zellen oder den entsprechenden Haplonten mit anschließender Kopulation führt zu recht ähnlichen M-Werten, wenn man berücksichtigt, daß der

---

1) Ähnliche Aufspaltungen wurden bereits von JAMES 1959 mitgeteilt, ohne jedoch in dieser Weise gedeutet zu werden. Inwieweit auch MAGNI u. MORTIMER ähnliche Aufspaltungen erhielten, läßt sich aus den summarischen Werten ihrer Tabellen nicht erkennen.

Stamm H 168 mit 50 kr ($M_2 \approx 0{,}4$), die Haplonten jedoch nur mit 40 kr bestrahlt wurden ($M_{11} = 0{,}6$). Dagegen erhält man, wenn nur ein Haplont bestrahlt wird, wesentlich weniger Kulturen ohne letale Sporen ($M_1 \approx 0{,}08$). Dieser unerwartet geringe M_1-Wert läßt eine Interpretation in dem in 2.3.4.1. gemachten Modell nur zu, wenn man $\bar{W} > 1$ wählt. Das würde bedeuten, daß in einem Diplonten, der aus einer unbestrahlten und einer bestrahlten Zelle entsteht, quasi rezessiv letal wirkende Mutationen besser "manifestiert" werden, als in aus zwei bestrahlten Haplonten entstehenden Zygoten. Wären z.B. unmittelbar nach der Kopulation anlaufenden Sythesen für die Manifestierung der interessiernden Genveränderungen nötig (KADA, DOUDNEY, HAAS 1960), so könnten möglicherweise in den "halb unbestrahlten" Zygoten diese Prozesse schneller anlaufen und damit mehr rezessiv letale Mutationen zur Ausprägung kommen.
Daneben muß man jedoch berücksichtigen, daß auch Selektionsprinzipien bei der in Massentechnik durchgeführten Kopulation zur Verschiebung der M_{11}-Werte führen können. -
Falls sich dieser Einwand entkräftigen ließe, würde es sich um eine Abhängigkeit von Mutationsraten von dem nach der Bestrahlung vorhandenen intrazellulären Zustand handeln.

c) Im Hinblick auf die Inaktivierung der Haplonten von besonderer Bedeutung ist ein Vergleich der gefundenen M-Werte mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der haploiden Stämme bei der benutzten Dosis ($ü_1 \approx 0{,}1$ für beide Haplonten[1]). Nimmt man an, daß die Inaktivierung der Haplonten hauptsächlich durch rezessiv letal wirkende Mutationen bedingt ist, so sollte man in der einfachsten Vorstellung erwarten, daß $M_{11} = M_2 \approx ü_1^2$ und $M_1 \approx ü_1$ ist. Letztere Beziehung kann beim vorliegenden Material als erfüllt gelten ($0{,}1 \approx 0{,}08$), während erstere ($0{,}4$ bzw. $0{,}6 \approx 0{,}01$) nicht gegeben ist.
Daß $M_1 \approx ü_1$ ist, scheint den Ergebnissen von MORTIMER 1961 und MAGNI 1959 zu widersprechen. Dieser Widerspruch beruht

---

1) Die Überlebenswahrscheinlichkeit des Diplonten H 168 betrug bei der gleichen Dosis ca. 0,9.

hauptsächlich auf der Definition dessen, was als eine Kultur mit rezessiv letalen Veränderungen bezeichnet wird. MORTIMER 1961 definiert: "... a lethal was scored if no more than 2 spores were viable in each of the asci". Dadurch rechnet er wesentlich mehr Kulturen als rein vital, wie hier (Definition siehe 3.2.1.) geschehen ist. Seine Definition scheint nicht berechtigt, wenn man die oben diskutierten komplizierten Aufspaltungsverhältnisse mitberücksichtigt. Würde das vorliegende Material nach dem Kriterium von MORTIMER bewertet, so wäre wie bei ihm $M_1 \gg \ddot{u}_1$.
Betrachtet man die Ergebnisse der Kulturen H 168-81 bis H 168-95, so weisen sie darauf hin, daß in Haplonten komplizierte, aber insgesamt rezessiv letal wirkende genetische Veränderungen einen größeren Beitrag zur Inaktivierung liefern können. Diese Argumentation wird nicht von den Ergebnissen der Kulturen bestätigt, die entweder aus direkt als Diplonten bestrahlten Zellen oder aus den durch Kopulation zweier bestrahlten Haplonten resultierenden Zygoten erhalten wurden.
Aus dem vorliegenden Material läßt sich die Annahme nicht ausschließen, daß die gegenüber $\ddot{u}_1^2$ großen Werte von M_{11} bzw. M_2 dadurch entstehen, daß es zur Segregation rezessiv letal wirkender Genveränderungen in den an rezessiv letalen Mutationen besonders "reichen" Zellen kommt oder daß diese nicht sporulieren und dadurch der Analyse entgehen.
d) Für die Aufklärung der Wirkungsweise der rezessiv letalen Mutationen von Interesse ist das Verhalten der letalen Sporen. Neben den im Sporenstadium liegenbleibenden machen einige Restteilungen durch.
So zeigten sich in einigen Kulturen z.B. folgende Verhältnisse:

Kultur	Zahl der letalen Sporen	Davon als Spore liegengeblieben
H 168-C_{16}	17	8
H 168-C_3	20	4
H 168-83	57	17

Es gibt sowohl in den monohybrid aufspaltenden (z.B. H 168-16) als auch in den eine kompliziertere Aufspaltung zeigenden Kulturen (z.B. H 168-17) Sporen, die keine Restteilungen durchmachen. Dies läßt darauf schließen, daß die Inaktivierung der Sporen durch genetische Schäden sowohl unmittelbar nach der Meiose als auch nach einigen Teilungen erfolgen kann. Es ist recht unwahrscheinlich, daß die direkte Letalität der Sporen auf die Wirkung strahleninduzierter plasmatischer Effekte zurückgeht, da diese in den die Meiose ausführenden Zellen sehr stark verdünnt oder ganz abgeklungen sein müßten.
Zusammenfassend soll betont werden, daß die Vorstellung, in Tetradenanalysen nach Röntgenbestrahlung nur jeweils einzeln segregierende, "klassische" rezessiv letal wirkende Mutationen zu finden, revidiert werden muß; es gibt komplizierte und bisher nicht befriedigend erklärte Aufspaltungen. Inwieweit der Anteil der komplizierter wirkenden rezessiven Letalfaktoren insgesamt ausreicht, um die Inaktivierung haploider Stämme zu erklären, muß dahin gestellt bleiben, bis die Ursachen geklärt sind, die dazu führen, daß bei Bestrahlung nur eines Haplonten mehr quasi rezessiv letale Mutationen beobachtet werden, als bei der Bestrahlung von Diplonten oder den beiden anschließend zur Kopulation gebrachten Haplonten.

3.3. Zur strahleninduzierten Entstehung homozygoter Linien in heterozygoten Saccharomyces-Stämmen

Neben der Auslösung von Punkt-, Chromosomen-, Genommutationen und der inaktivierenden Wirkung energiereicher Strahlen wurden an genetisch gut markierbaren Mikroorganismen (Aspergillus nidulans, Astilago maydis, Saccharomyces und Neurospora crassa) von verschiedenen Autoren sowohl nach UV- als auch nach Röntgenstrahlen gehäuft genetische Umkombinationen in heterozygot oder heteroallel markierten diploiden Organismen gefunden (ausführliche Arbeiten an Hefen sind z.B. ROMAN u. JACOB 1958, TOWE u. STADLER 1964, SHERMAN u. ROMAN 1963, ROMAN 1963, FOGEL u. HURST 1963, HURST u. FOGEL 1964). Beobachtet wurde insbesondere, daß

nach Bestrahlung in Stämmen mit heterozygoten bzw. heteroallelen diploiden Genomen homozygote bzw. homoallele Zellen auftreten. Ohne daß im einzelnen genau geklärt ist, um welche genetischen und molekularen Prozesse es sich hierbei handelt, sollen im folgenden derartige Umkombinationen als "mitotisches crossover" bezeichnet werden, wenn beide homozygoten Partner auftreten, und als Genkonversion, wenn nur ein Partner vorliegt ("nichtreziproker Austausch"). Eine Zusammenstellung der verschiedenen Prozesse, die ohne Meiose zu homozygoten Linien in heterozygoten Diplonten führen, findet sich z.B. bei WILKIE u. LEWIS 1963 und HURST u. FOGEL 1964. Eine nicht alle experimentellen Ergebnisse erklärende molekulare Deutung gab z.B. WHITEHOUSE 1963.
Benutzt man zur Auffindung und zur Ermittlung der Häufigkeit der homoallelen bzw. homozygoten Zustände Selektionsmethoden (Prototrophie- oder Stempeltechnik), so beobachtet man die Häufigkeit, mit der die eine homozygote Form auftritt (ROMAN u. JACOB 1957). Durch spezielle genetische Markierungen sowie geeignete Methoden gelingt es auch, beide Partner des "Austausches" zu erhalten.
Bei Saccharomyces wurde insbesondere die Dosisabhängigkeit derartiger Umkombinationen in heteroallel markierten Stämmen (ROMAN u. JACOB 1957) sowie in heterozygoten Diplonten (FOGEL u. HURST 1963) nach UV-Bestrahlung ermittelt. Ferner wurde versucht, eine Korrelation zwischen Centromerabstand der untersuchten Gene und Häufigkeit der Austauschprozesse zu finden (FOGEL u. HURST 1963 und WILKIE u. LEWIS 1963 für UV, MORTIMER 1957 für Röntgenstrahlen). Die Ergebnisse für UV sichern keine derartige Korrelation, während für Röntgenstrahlen ein Zusammenhang zwischen Centromerabstand der betreffenden Gene und dem Auftreten homozygot auxotropher Kolonien aus heterozygot markierten Diplonten gefunden wurde[1].
Ungeklärt blieb bisher die Frage, wie es durch Bestrahlung zur Bildung rein auxotropher Kolonien in heterozygot proto-

1) Die Arbeit von MORTIMER 1957 enthält keine quantitativen Angaben.

trophen,diploiden Stämmen kommt und welche Mechanismen einer derartigen "Genkonversion" zugrunde liegen. Es muß dabei entweder zu einem Verlust der homologen Gene- und damit der Information "prototroph", z.B. durch copy chioce bei der DNS-Reduplikation - oder zu einer Inaktivierung der Zellen kommen, die nach einem möglicherweise reziproken Austausch die prototrophen Allele enthalten.
Für die vorliegende Arbeit ist gerade dieser Verlust von Genen durch Segregation homozygoter Zellen nach Bestrahlung von besonderer Bedeutung, da durch diesen Prozess möglicherweise in ursprünglich homozygoten Saccharomyces-Stämmen strahleninduzierte, und dann heterozygot vorliegende "Rückmutationen" verlorengehen können.
Da es methodisch sehr schwierig ist, direkt zu prüfen, wie viele neuentstandene Mutationen durch strahleninduzierte, mitotische Umkombinationen verlorengehen, erschien es sinnvoll, zuerst quantitative Angaben über das Auftreten von auxotrophen Kolonien nach Röntgen- und UV-Bestrahlung in heterozygot markierten Diplonten zu sammeln und insbesondere Anhaltspunkte zu finden, wo die allelen prototroph wirkenden Gene verbleiben. Wichtig für quantitative Diskussionen ist dabei die Klärung der Dosisabhängigkeit und die Auffindung einer möglichen Korrelation zwischen Centromerabstand und Häufigkeit des Auftretens homozygot auxotropher Kolonien in heterozygot markierten Diplonten und Polyplonten.

3.3.1. Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien als Funktion der Dosis und des Centromerabstandes der Markierungsgene nach Röntgen- und UV-Bestrahlung

Mit der in 2.4. geschilderten Technik wurde ermittelt, mit welcher Häufigkeit nach der Bestrahlung im Stamm H 168 auxotrophe Kolonien auftraten. Als Funktion der Bestrahlungsdosis zeigt dies Tab. 11 in Spalte 5. Man erkennt einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien und der Röntgen- bzw. UV-Dosis.

Wirksame Dosis	Überlebende [%]	Zahl der gestempelten Kolonien (C)	Zahl der auxotrophen Stempelabdrücke (D)	$\frac{D}{C}$ [%]
50 kr	80	2262	52	2,3
90 kr	12	2987	281	9,5
200 kr	0,7	1445	311	21,5
5' UV	4,6	3180	162	5,1
8' UV	0,55	390	99	25

Tab. 11 Häufigkeit des Auftretens von homozygot auxotrophen Zellen nach Bestrahlung

Stamm H 168. Zur Technik siehe 2.4.

In unbestrahlten Kontrollen wurden insgesamt 1747 Kolonien überprüft, wobei nur 2 auxotroph waren, so daß sich eine Korrektur der Werte nach Bestrahlung erübrigt.

Um den Zusammenhang zwischen Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien und dem Centromerabstand des betreffenden Gens für das vorliegende Material zu prüfen, wurden ca. 50 % der erhaltenen auxotrophen Kolonien auf ihre genauen Bedürftigkeiten hin untersucht. Neben zahlreichen nur für einen Stoff auxotrophe Kolonien ergaben sich auch zwei- und dreifache auxotrophe, die, ähnlich wie von WILKIE u. LEWIS 1963 beschrieben, darauf hin weisen, daß es keine Koppelung zwischen den Häufigkeiten, mit denen die einzelnen Auxotrophien auftreten,gibt.

Für den interessierenden Zusammenhang war es nötig, die Centromerabstände der Markierungsgene genau zu kennen. Diese könnten im Prinzip aus den bekannten Genkarten von Saccharomyces entnommen werden (HAWTHORNE u. MORTIMER 1960, YEAST GENETICS CONFERENCE 1961), da aber bekannt ist, daß die Centromerabstände vom genetischen Hintergrund abhängen, wurden sie für den vorliegenden Stamm erneut durch mikromanipulatorische Tetradenanalyse bestimmt. Aus der Ordnung der Bedürftigkeiten der Sporen ließen sich jeweils die Tetraden direkt erkennen, die für ein oder mehrere Markierungsgene

vom Tetratyp waren. Aus dem den Ein- und Dreifach-Austausch repräsentierenden Anteil der Tetraden vom Tetratyp wurden unter Berücksichtigung des Zwei- und Vierfach-Austausches der Abstand bzw. die Abstandssumme der Markierungsgene vom Centromer ermittelt (Tab. 12).

Der Stamm H 168 ist für Lysin und Histidin jeweils 2fach heterozygot markiert, deshalb sollte für diese Gene eine dihybride Aufspaltung der Sporen von prototroph : auxotroph = 1 : 3 auftreten. Dies ist für die die Lysin-Synthese steuernden Gene recht gut erfüllt (155 : 433 = 1 : 2,8), während für die beiden die Histidin-Synthese steuernden Gene eine starke Abweichung vorliegt. Nach den aus der Tetraden-

Markierungsgen(e)	Analysierte Tetraden	Sporen		Tetraden vom Tetratyp	Centromerabstand bzw. Abstandssumme [%]	
		prototroph	auxotroph		eigene Werte	nach HAWTHORNE u. MORTIMER 1960
ly_1 + ly_2	147	155	433	84	55	74
hi_2 + hi_4 [1]	146	229	355	46	25 [2]	40
ad_1	149	297	299	24	11	5
ar_4	147	293	295	27	13	7
ur_3	74	148	148	13	12	5
le_1	148	295	297	9	3	2
tr_1	148	296	296	2	0,7	1

Tab. 12 Bestimmung der Centromerabstände der 9 Markierungsgene im Stamm H 168 Alle Tetradenanalysen wurden mikromanipulatorisch durchgeführt (Technik siehe 2.6.).

1) Inwieweit die Histidin-Bedürftigkeit wirklich durch diese Gene bedingt ist, muß ungeklärt bleiben.

2) Dieser Wert gibt die aus den Tetradenanalysen ermittelte Summe der Abstandshäufigkeiten beider Gene vom Centromer.

analyse zu entnehmenden Daten kann es sich nicht wie bei den wirklichen Genen hi_2 und hi_4 um ungekoppelte Marker handeln, die hier vorliegenden Gene müssen vielmehr gekoppelt auf einem Chromosom liegen. Dies Problem wurde nicht weiter verfolgt, da es für die hier interessierenden Ergebnisse nicht von Wichtigkeit ist. - Die anderen Gene zeigen die erwartete 1 : 1 Aufspaltung, wobei einige wenige anomale Tetraden beobachtet wurden.

Vergleicht man die Spalten 6 u. 7 der Tab. 12, so erkennt man eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den Werten von HAWTHORNE u. MORTIMER 1960 und den hier ermittelten, die Abweichungen liegen im Bereich der aus der Literatur für Chromosomenabstände bestimmter Markierungsgene in unterschiedlichen Stämmen bekannten Abweichungen (siehe dazu z.B. die von den gleichen Autoren in YEAST GENETICS CONFERENCE 1961 publizierten Werte).

Vergleicht man die ermittelten Häufigkeiten für das Auftreten homozygot auxotropher Kolonien mit dem Centromerabstand der betreffenden Markierungsgene, so ergeben sich für die untersuchten Röntgen- bzw. UV-Dosen die Werte A/B der Tab. 13 bzw. 14. Nur bei hohen Dosen und kleinen Centromerabständen erreichen oder übersteigen die strahleninduzierten mitotischen Austauschprozesse die Häufigkeit der meiotischen ($\frac{A}{B} \geq 1$).

Für eine Erklärung der unerwarteten Ploidiegradabhängigkeit der UV-induzierten "Rückmutationsraten" der IV-auxotrophen Stämme ist es wichtig zu prüfen, wie hoch der Anteil von auxotrophen Kolonien ist, wenn polyploide IV-prototrophe, aus UV-Experimenten entnommene "Rückmutanten" erneut mit UV bestrahlt werden. Für die triploide "Rückmutante" 3 IV4 ergab sich nach einer wirksamen UV-Dosis von 11 min. bei einer Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 1,2 % ein Anteil von auxotrophen Kolonien (bezogen auf alle gestempelten Kolonien, $\frac{D}{C}$ entsprechend Tab. 11) von $\frac{22}{1111} = 2$ %.

Für eine tetraploide "Rückmutante" (4 IV3) ergab sich bei der gleichen Dosis und einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,93 % ein Wert von $\frac{D}{C} = \frac{26}{1103} = 2{,}3$ %. Beide "Rückmutanten" waren nach einer wirksamen Dosis von D = 2 min isoliert worden.

Dosis [kr]	Zahl der insgesamt untersuchten auxotrophen Kolonien	Davon bedürftig für:	Anteil der auxotrophen Kolonien an den Überlebenden*) (A) [%]	Abstand bzw. Summe der Abstände der Marker vom Centromer (B) [%]	$\frac{A}{B} \cdot 10^2$
50	34	Lysin 9	0,95	55	1,7
		Histidin 10	1,05	25	4,2
		Uracil 2	0,2	11	1,8
		Argenin 5	0,5	13	4,0
		Adenin 3	0,3	12	2,5
		Leucin 3	0,3	3	10
		Tryptophan 2	0,2	0,7	29
90	129	Lysin 42	3,1	55	5,6
		Histidin 32	2,3	25	9,2
		Uracil 27	2,0	11	18
		Argenin 15	1,1	13	8,5
		Adenin 34	2,5	12	21
		Leucin 6	0,44	3	14,5
		Tryptophan 9	0,65	0,7	93
200	108	Lysin 40	8,0	55	15
		Histidin 22	4,4	25	18
		Uracil 15	3,0	11	27
		Argenin 16	3,2	13	25
		Adenin 28	5,6	12	47
		Leucin 9	1,8	3	60
		Tryptophan 4	0,8	0,7	110

Tab. 13 Beziehung zwischen Centromerabstand der Markierungsgene und Häufigkeit des Auftretens auxotropher Zellen nach Röntgen-Bestrahlung.

*) Da nur ein willkürlich ausgewählter Anteil aller beobachteten auxotrophen Kolonien weiter untersucht wurde, ist A auf den entsprechenden Anteil an Überlebenden bezogen.

Wirksame UV-Dosis [min]	Zahl der insgesamt untersuchten auxotrophen Kolonien	Davon bedürftig für:	Anteil der auxotrophen Kolonien an den Überlebenden*) (A) [%]	Abstand bzw. Summe der Abstände der Marker vom Centromer (B) [%]	$\frac{A}{B} \cdot 10^2$
5	135	Lysin 49	1,8	55	3,3
		Histidin 34	1,3	25	5,2
		Uracil -	-	11	-
		Argenin 15	0,57	13	4,5
		Adenin 18	0,68	12	6,2
		Leucin 17	0,64	3	21
		Tryptophan 4	0,15	0,7	21
8	44	Lysin 8	4,6	55	8,4
		Histidin 10	5,8	25	23
		Uracil 4	2,3	11	21
		Argenin 5	2,9	13	23
		Adenin 14	8,0	12	70
		Leucin 3	1,7	3	57
		Tryptophan 2	1,1	0,7	160

Tab. 14 Beziehung zwischen Centromerabstand der Markierungsgene und der Häufigkeit des Auftretens auxotropher Zellen nach UV-Bestrahlung.

*) Da nur ein willkürlich ausgewählter Anteil aller beobachteten auxotrophen Kolonien weiter untersucht wurde, ist A auf den entsprechenden Anteil an Überlebenden bezogen.

3.3.2. Zum Mechanismus der Entstehung homozygot auxotropher Zellen in heterozygot markierten prototrophen Stämmen nach Bestrahlung

Für die Diskussion einer möglichen Reduktion von strahleninduzierten Mutationsraten durch das Auftreten von homozygoten Kolonien in heterozygoten Stämmen und im Hinblick auf die verschiedenen Interpretationen, die in der Literatur diskutiert werden, erschien es interessant, den Mechanismus näher zu untersuchen. - Eine wichtige Frage ist dabei, wo die entsprechenden prototroph wirkenden Allele verbleiben. Um dies an dem vorliegenden Stamm zu untersuchen, bieten sich zwei Möglichkeiten an:

a) Man prüft, ob in den beim Stempelabdruck als auxotroph klassifizierten Kolonien prototrophe Zellen vorhanden sind, oder

b) man nimmt von relativ hoch bestrahlten Zellen Teilungsstammbäume auf und überprüft, inwieweit innerhalb eines Teilungsstammbaumes eine Segregation von prototroph und auxotroph auftritt.

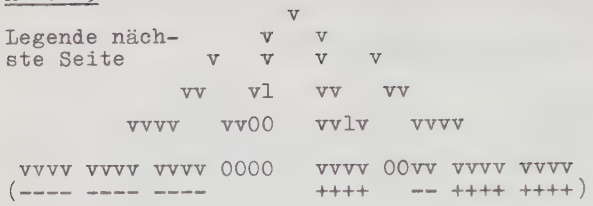
Zu a) 84 durch Stempeln auf H-Mangelmedium als auxotroph klassifizierte Kolonien des Stammes H 168 wurden von dem YP-Medium, auf dem sie nach Bestrahlung mit 90 kr aufgewachsen waren, vollständig abgeimpft, in 0,6 ml Puffer aufgeschwemmt und auf jeweils 3 Platten H-Mangelmedium ausgeplattet. Das Wachstum dieser Zellen wurde nach 6 Tagen inspeziert. Die Bedürftigkeiten dieser Kolonien konnten dann folgendermaßen klassifiziert werden: 1. Auf allen 3 Platten wuchsen keine oder maximal 2 prototrophe Kolonien; da diese durch die spontane Mutabilität erklärbar sind, wurden solche Kolonien noch als rein auxotroph klassifiziert.
2. Auf allen 3 Platten waren zwischen 3 und einigen 100 prototropher Kolonien, zwischen denen ein Rasen auxotropher Zellen lag; Kolonien,deren Ausstrich dieses Wachstum zeigte, wurden als"gemischt" bezeichnet. 3. Auf den Platten bildete sich ein Rasen; Kolonien mit einem derartigen Wachstum wurden als prototroph gewertet, obwohl nicht aus-

zuschließen ist, daß sie noch zahlreiche auxotrophe Zellen enthalten.
Von den 84 untersuchten Kolonien waren:

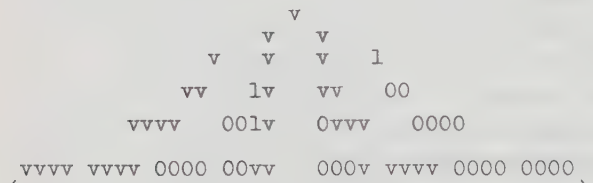
auxotroph	43	(51 %)
"gemischt"	26	(31 %)
prototroph	15	(18 %)

Der relativ hohe Anteil der prototrophen kann entweder darauf zurückgehen, daß es sich um sektorierte Kolonien handelt, die beim Stempeln, falls der prototrophe Sektor relativ klein ist, nicht erkannt werden oder auf einer sonstigen Fehlklassifikation der Stempelabdrücke beruhen. -
Von den ausgestrichenen 43 auxotrophen Kolonien hatten 38, also auf die Gesamtheit bezogen 45 %, überhaupt keine prototrophen Kolonien. Das heißt, daß in der Hälfte aller bei dieser Dosis auxotroph klassifizierten Kolonien überhaupt keine prototrophen Allele zur Auswirkung kommen.
Zu b) Die Teilungsstammbäume (TSB) wurden, wie unter 2.5. bzw. 2.4. beschrieben, angelegt. Von den insgesamt 27 nach UV-Bestrahlung mit einer wirksamen Dosis von 5 min angelegten TSB enthielten 6, also 22 % gemischt auxotrophe und prototrophe Zellen. Diese Teilungsstammbäume zeigt Abb. 29. In 5 Stammbäumen von diesen 6 sind sowohl auxotrophe als auch prototrophe Linien vorhanden; ein Stammbaum (TSB 2) besitzt nur auxotrophe, vitale Zellen.
Im ganzen widersprechen die in den TSB beobachteten Segregationen nicht einem crossover-Mechanismus, die Deutung wird jedoch erschwert durch die stets vorhandenen letalen Zellen. Einige Stammbäume lassen vermuten, daß es auch nach der ersten Generation noch zur Segregation prototroph/auxotroph kommen kann.
Eine Analyse, inwieweit die innerhalb eines Stammbaumes segregierenden Zellen a l l e homozygot sind, konnte bisher nicht durchgeführt werden, da es nicht gelang, alle Zellkulturen, die aus einem Stammbaum resultierten, zur Sporulation zu bringen. Von den bisher untersuchten auxotrophen Segreganten waren alle homozygot für das betreffende Gen.

Abb. 29

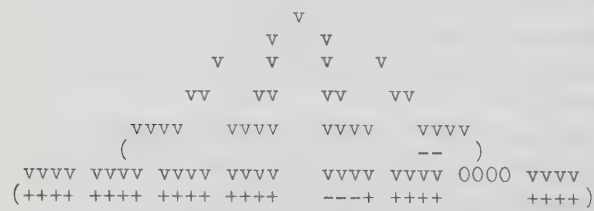


TSB 1. - = Lysin-auxotroph



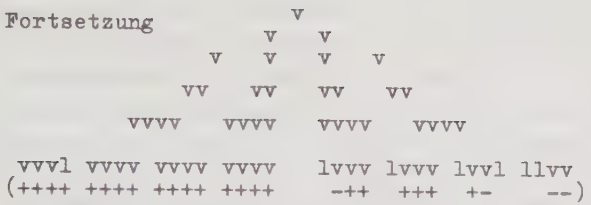
TSB 2. - = Lysin-auxotroph

TSB 3. - = Histidin-auxotroph

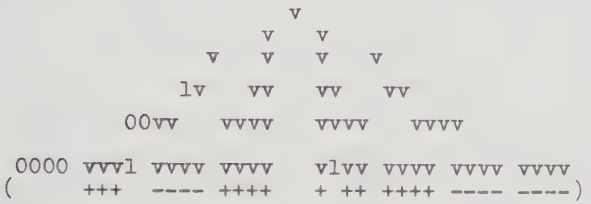


TSB 4. - = Uracil-auxotroph

Abb. 29



TSB 5. - = Adenin-auxotroph



TSB 6. - = Leucin-auxotroph

Abb. 29 Schematische Darstellung der Stammbäume, in denen nach UV-Bestrahlung (D = 10 min) eine Segregation in auxotrophe und prototrophe Zellen aufgetreten ist.

Stamm H 168. Jede Reihe stellt eine Generation dar. Die Buchstaben haben folgende Bedeutung:

v = Zelle, die vitale Nachkommen hat.
l = Zelle, die ausschließlich letale Nachkommen hat (avitale Zelle siehe 3.4.).
0 = Nichtangelegtes Glied des TSB bzw. letale Zelle, die von einer Zelle ohne vitale Nachkommen abstammte.
+ bzw. - = geben an, ob die aus der betreffenden Zelle aufgewachsene Kultur prototroph oder auxotroph war.

Die Ergebnisse der TSB weisen darauf hin, daß ein möglicher Prozess der zum Auftreten von auxotrophen Kolonien in heterozygoten prototrophen Stämmen nach UV-Bestrahlung führt, darin gesehen werden kann, daß a) reziproke Austauschprozesse auftreten und b) die die betreffenden homologen Gene tragenden Zellen inaktiviert oder teilungsgehemmt werden.

3.3.3. Diskussion unter besonderer Berücksichtigung der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten"

Für die Diskussion der Häufigkeit, mit der auxotrophe Zellen in heterozygot prototrophen di- oder polyploiden Stämmen nach Bestrahlung auftreten, ist es wichtig abzuschätzen, inwieweit auxotrophe Kolonien auch durch strahleninduzierte Mutationen des die Prototrophie bedingenden Gens entstehen. Eine grobe Abschätzung für UV läßt sich gewinnen, wenn man die unter ähnlichen experimentellen Bedingungen erhaltenen Ergebnisse für Mutationen von der Auxotrophie zur Prototrophie als Größenordnung für die UV-induzierte Mutabilität wählt; obwohl es denkbar ist, daß diese Mutationsraten prinzipiell höher sind als die für Mutationen von der Prototrophie zur Auxotrophie. Aus HAEFNER u. LASKOWSKI 1963 lassen sich für die "Rückmutation" zur Adenin-Prototrophie bei einem haploiden Adenin-auxotrophen Stamm für die hier interessierenden Dosen Raten von ca. $5 \cdot 10^{-3}$ extrapolieren. Berücksichtigt man, daß z.B. Tryptophan-auxotrophe Kolonien hier nach einer wirksamen Dosis von 8 min mit einer Rate von ca. 1 % auftreten, so ist von vornherein eine Beteiligung von Mutationen nicht ohne experimentelle Überprüfung auszuschließen, jedoch unwahrscheinlich[1].

Gegen Mutationen sprechen insbesondere die Ergebnisse der TSB, die nach Röntgenstrahlen eine Segregation in auxotrophe und prototrophe Zellen ergaben. Diese sind im Sinne einer mutativen Wirkung nur denkbar, wenn man annimmt, daß die Mutation erst verspätet und nur in einigen Nachkommen

---

1) ROMAN u. JACOB 1958 fanden ebenfalls für die von ihnen untersuchten Gene keine Beteiligung von Mutationen.

der bestrahlten Zellen manifestiert wird. Als ein weiteres Argument gegen die Beteiligung von Mutationen kann die beobachtete Korrelation zwischen Centromerabstand und beobachteter Häufigkeit angesehen werden.
Die sowohl für UV als auch für Röntgenstrahlen gefundene Beziehung zwischen Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien und Centromerabstand (Abb. 30a, b) steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von WILKIE u. LEWIS 1963, die überhaupt keine Korrelation zwischen Centromerabstand und Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien in heterozygoten prototrophen Diplonten nach UV-Bestrahlung gefunden haben, jedoch in Übereinstimmung mit Werten von FOGEL u. HURST 1963. - Für Röntgenstrahlen widersprechen die vorliegenden Ergebnisse den Befunden von MORTIMER 1957 nicht, in denen von einer Zunahme der Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien mit steigendem Centromerabstand der Markierungsgene nach Röntgenbestrahlung berichtet wird.

Auffällig ist, daß das Verhältnis von strahleninduzierter Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien und meiotischer Austauschhäufigkeit (A/B Tab. 13 u. 14) vom Centromerabstand abhängt.
Der Mechanismus, der zur Bildung relativ rein auxotropher Kolonien nach Bestrahlung heterozygot prototropher Diplonten führt, läßt sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse der TSB und unter Ausschluß von Mutationen in zwei Teile aufspalten: a) Segregation der Heterozygoten in homozygote Formen durch wahrscheinlich reziproke Mechanismen und b) Inaktivierung oder sonstige Ausschaltung der prototrophen Segreganten.
Für einen (meioseähnlichen) reziproken Austauschprozess sprechen die mit dem Centromerabstand bis zu einer Sättigung ansteigenden A-Werte (Abb. 30) und das Auftreten von sowohl prototrophen als auch auxotrophen Gliedern in den TSB. Die Ausschaltung der homozygot prototrophen Segreganten kann durch die stets nach Bestrahlung auftretende Inaktivierung einzelner- und zufällig auch prototropher - Nachkommen der bestrahlten und überlebenden Zellen verur-

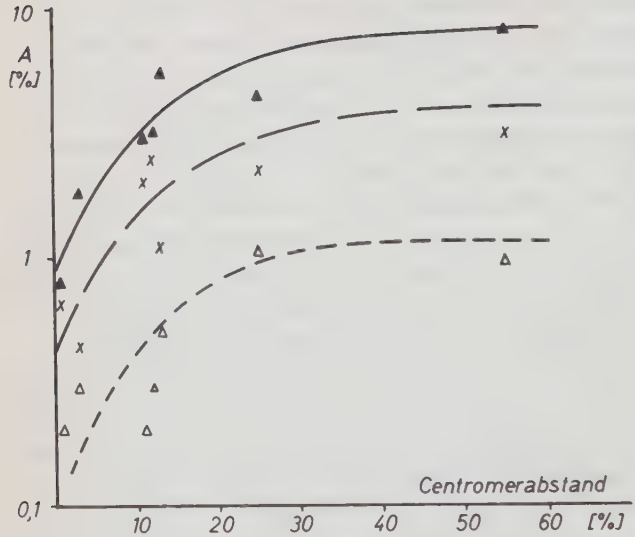


Abb. 30a

Rö-Bestrahlung

Δ 50 kr
x 90 kr
▲ 200 kr

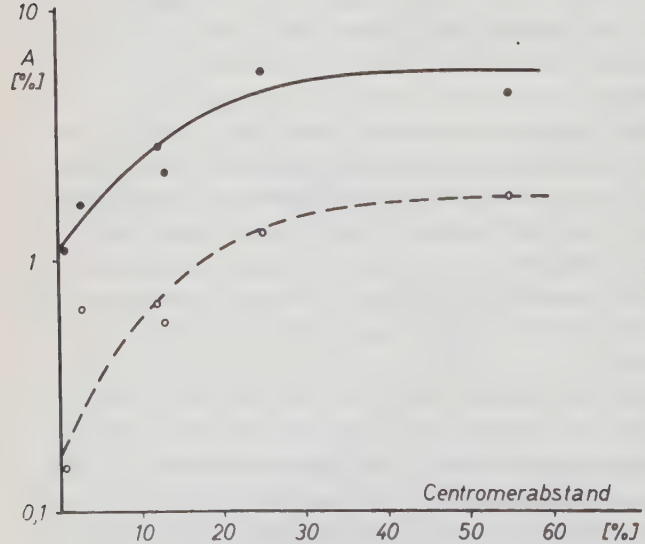


Abb. 30b

UV-Bestrahlung

o 5 min
● 8 min

[wirksame UV-Dosis]

Abhängigkeit der Häufigkeit des Auftretens auxotropher Kolonien (A) vom Centromer (B).

Die Werte A u. B sind aus den Tab. 13 u. 14 Spalte 4 u. 5 entnommen.

sacht werden.(Zur Inaktivierung von Nachkommen von Zellen die im Endeffekt vitale Kolonien bilden siehe auch 3.4.). Obwohl der Verlust heterozygot vorhandener Gene durch Bestrahlung in Di-, Tri- und Tetraplonten bezogen auf die Mutabilität relativ hoch ist, reicht er nicht direkt aus, um einen wesentlichen Beitrag zur Erklärung der starken Abnahme der UV-induzierten "Rückmutationsraten" in Stämmen höheren Ploidiegrades zu geben. Auch bei hohen Dosen gehen maximal nur einige Prozent der eine bestimmte Prototrophie bedingenden Gene verloren, während der Abfall der Mutationsrate vom Haplonten, für den keine derartigen Verluste zu erwarten sind, zum Tri- und Tetraplonten und in einem bestimmten Dosisbereich auch zum Diplonten eine Größenordnung ausmacht (siehe Abb. 26).
Gegen einen derartigen Einfluß der Verluste spricht auch der Befund, daß sich die Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" für UV- und Röntgenstrahlen stark unterscheidet, während sich die Induktionswahrscheinlichkeit für auxotrophe Kolonien in heterozygot prototrophen Stämmen bei gleichen effektiven Dosen nur wenig unterscheiden.
Ungeklärt muß die Frage bleiben, inwieweit die hier durchgeführten Experimente über den Verlust genetisch fixierter Allele prinzipiell für die Diskussion des Verlustes von Genen, in denen erst Mutationen manifestiert werden, repräsentativ sind. Dieses Problem ist besonders dann kompliziert, wenn es einen bisher nicht untersuchten Zusammenhang zwischen strahleninduzierten mitotischen Austauschprozessen und strahleninduzierter Mutabilität gibt, so wie eine Korrelation zwischen meiotischen Austauschprozessen und der spontanen Mutabilität besteht (MAGNI 1963).

3.4. Überprüfung des Kriteriums "Koloniebildungsfähigkeit = Freiheit von letal wirkenden strahleninduzierten Zuständen" anhand von Teilungsstammbäumen.

Wie unter 1. erörtert, gibt es Hinweise, daß bevorzugt nach Bestrahlung in aufwachsenden Kolonien Zellen vorhanden sind, die ausschließlich letale Nachkommen liefern oder selbst letal sind. Für die Erklärung dieses Befundes bieten sich mehrere Modelle an: Es ist denkbar, daß plasmatische Schäden weitergegeben werden und erst in späteren Generationen zur Inaktivierung führen. Oder es handelt sich um genetische Schäden, die entweder durch spätere Inkorporation von zur Mutation führenden veränderten Zellbausteinen oder durch verspätete und in verschiedenen Zellen unterschiedliche Fixierung genetischer Veränderungen entstehen.
Um Entscheidungen zwischen diesen verschiedenen denkbaren Modellen durchzuführen, erscheint es nötig, folgende Fragen zu klären:
a) Wie groß ist der Anteil von unbestrahlten Kolonien, in denen Zellen vorhanden sind, die ausschließlich letale Nachkommen haben oder selbst letal sind[1)]?
b) Wie groß ist der Anteil an nach Bestrahlung aufwachsenden Kolonien, in denen Zellen auftreten, die avital sind?
c) Wie hängen die unter a) und b) aufgeführten Anteile vom Ploidiegrad der Zelle ab?
Und d) wie groß sind in den ersten Generationen die Anteile der avitalen Zellen? Hängen diese Anteile vom Ploidiegrad ab?

---

1) Im folgenden sollen alle die Zellen, die entweder selbst letal sind oder ausschließlich letale Nachkommen haben, also nur Restteilungen durchführen, kurz als avital bezeichnet werden.

3.4.1. Ergebnisse der TSB-Kontrollen

Von den für die Aufnahme von Teilungsstammbäumen verwendeten Stämmen wurden unter sonst gleichen Bedingungen, aber ohne Bestrahlung jeweils TSB mit jeweils insgesamt 5 Generationen in der unter 2.5. angegebenen Weise angelegt. Dabei ergaben sich die in Tab. 15 zusammengestellten Ergebnisse. Ein Vergleich mit der Zahl der nach UV- bzw. Röntgenbestrahlung auftretenden avitalen Zellen ergibt, daß der Anteil der avitalen Zellen in den Kontrollen so gering ist, daß er bei Ermittlung des Anteils avitaler Zellen nach Bestrahlung vernachlässigt werden kann.

Stamm	Beobachtete TSB	
	ohne avitale Zellen	mit avitalen Zellen
	in () Anteil in %	
A 103	12 (100)	0 (0)
H 168	9 (100)	0 (0)
400	24 (90)	3 (10)

Tab. 15 TSB unbestrahlter Zellen

Als avital wurden die Zellen gezählt, die entweder selbst letal sind oder ausschließlich letale Nachkommen haben.

3.4.2. Ergebnisse der Teilungsstammbäume nach UV

Nach UV- und Rö-Bestrahlung gibt es, wenn man die ersten 5 Generationen der TSB berücksichtigt, 3 verschiedene Typen von Zellen: a) diejenigen, die TSB mit ausschließlich vitalen Nachkommen bilden, b) die, die TSB mit vitalen und avitalen Zellen ergeben, und c) die, welche entweder ohne Teilung inaktiviert sind oder noch einige Restteilungen

durchführen. Die Gruppe c) stellt die inaktivierten Zellen, ihr Anteil ist gleich 1-Überlebenswahrscheinlichkeit, Zellen der Gruppen a) und b) ergeben makroskopische Kolonien und werden in der sonst üblichen Technik als "Überlebende" gezählt.

Die Häufigkeiten, mit denen die einzelnen Gruppen nach UV-Bestrahlung auftreten, gibt Tab. 16 für die wirksame Dosis D = 10 min für den Di- und Tetraplonten und für D = 5 min für den Haplonten[1]. Vergleicht man die Spalten 2 u. 5 der Tab. 16, so erkennt man, daß nur ca. 1/3 der aufgewachsenen Zellen echt vitale Kolonien ergeben, 2/3 geben Kolonien mit avitalen Zellen; dieser Prozentsatz kann möglicherweise noch größer werden, wenn man auch spätere Generationen als die 5. mitberücksichtigt.

Stamm	Überlebens-wahrscheinlichkeit [%]	Beobachtete TSB		Anteil der TSB		
		ohne avitale Zellen	mit avitalen Zellen	ohne avitale Zellen [%]	mit avitalen Zellen [%]	mit ausschließlich avitalen Zellen (1 - ü) [%]
H 168 (diploid)	5	6	21	1,1	3,9	95
400 (tetrapl.)	10	8	18	3,1	6,9	90
A 103 (haploid)	10	11	9	5,5	4,5	90

Tab. 16 Übersicht über die nach UV-Bestrahlung beobachteten Häufigkeiten der verschiedenen TSB

Wirksame Dosis 10 min UV für H 168 und 400, für A 103 5 min UV. Zur Ermittlung der Anteile der TSB mit vitalen Zellen (Spalte 5 u. 6) wurde der Anteil der makroskopisch bestimmten Überlebenden entsprechend den Werten in Spalte 3 u. 4 aufgeteilt.

1) Die Überlebenswahrscheinlichkeit für den Haplonten ist bei der Dosis 10 min bereits so klein, daß es dort nicht mehr gelang, TSB aufzunehmen.

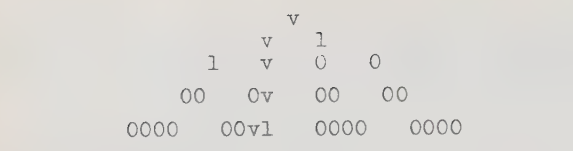
Das Aussehen einiger typischer TSB, wie sie nach UV-Bestrahlung für den diploiden Stamm H 168 und den Tetraplonten 400 gefunden wurden, zeigen Abb. 29 u. 31. Man erkennt, daß in allen Generationen avitale Zellen auftreten können. In Tab. 17 wurde die Zahl der pro Generation beobachteten vitalen und avitalen Zellen zusammengestellt. Dabei wurden nur TSB berücksichtigt, die mindestens eine avitale Zelle enthielten. Die aus Restteilung der avitalen Zellen resultierenden Zellen blieben dabei unberücksichtigt. Der TSB 3, Abb. 31 wurde z.B. in folgender Weise ausgewertet:

in der	I. Generation :	2 vital	0 avital
in der	II. Generation :	2 vital	2 avital
in der	III. Generation :	3 vital	1 avital
in der	IV. Generation :	6 vital	0 avital
in der	V. Generation :	11 vital	1 avital

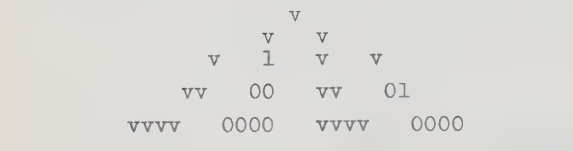
Stamm	Wirksame UV-Dosis [min]	Zahl der vitalen (v) und der avitalen (a) Zellen und in () Anteil der avitalen [%] in der ...Generation									
		I		II		III		IV		V	
		v	a	v	a	v	a	v	a	v	a
H 168 (diploid)	10	38	4 (9,5)	68	9 (12)	114	12 (9,5)	207	12 (5,5)	386	6 (1,5)
400 (tetrapl.)	10	31	6 (19)	52	8 (13)	89	14 (14)	155	11 (6,6)	273	17 (5,9)
A 103 (haploid)	5	17	1 (6)	30	4 (13)	61	1 (1,6)	99	1 (1,0)	218	4 (1,8)

Tab. 17 Häufigkeit avitaler Zellen in TSB nach UV-Bestrahlung

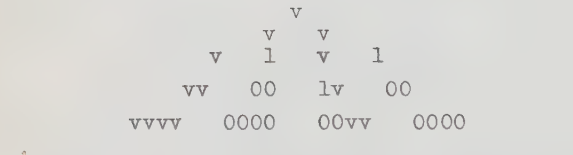
Es wurden nur TSB ausgewertet, die mindestens eine avitale Zelle hatten. Alle Anteile sind auf die in der betreffenden Generation vorhandenen vital und avitalen Zellen bezogen, wobei Restteilungen der avitalen unberücksichtigt blieben. (Näheres siehe Text.) - Für einen Vergleich der Stämme verschiedenen Ploidiegrades sind die unterschiedlichen Dosen zu beachten.



TSB 1.



TSB 2.



TSB 3.

Abb. 31 Typische TSB nach 10 min wirksamer UV-Dosis.
Stamm 400

Jede Reihe stellt eine Generation dar. Die Buchstaben haben folgende Bedeutung:

v = vitale Zelle
l = avitale Zelle
0 = nicht angelegtes Glied des TSB bzw. Nachkomme einer avitalen Zelle

Der Anteil der avitalen wurde auf die Summe der so gezählten vitalen und avitalen Zellen bezogen. - Die Häufigkeit, mit denen avitale Zellen pro Generation auftreten, nimmt mit steigender Generation ab (Tab. 17).

3.4.3. Ergebnisse der Teilungsstammbäume nach Röntgenbestrahlung

In analoger Weise wie für UV wurden die Ergebnisse nach Röntgenbestrahlung ermittelt. Tab. 18 zeigt den Anteil der verschiedenen TSB-Typen nach einer für alle Stämme einheitlichen Dosis von 100 kr. Man erkennt einen deutlichen Anstieg des relativen Anteils der TSB ohne avitale Zellen vom Diplonten zum Tetraplonten. Das Material für den Haplonten ist zu gering, um sichere Aussagen über einen Abfall vom Diplonten zum Haplonten machen zu können.—Die Verteilung der avitalen Zellen in den verschiedenen Generationen gibt Tab. 19.

Stamm	Überlebenswahrscheinlichkeit [%]	Beobachtete TSB		Anteil der TSB		
		ohne avitale Zellen	mit avitalen Zellen	ohne avitale Zellen [%]	mit avitalen Zellen [%]	mit ausschließlich avitalen Zellen [%]
A 103 (haploid)	4	2	5	1,1	2,9	96
H 168 (diploid)	21	10	31	5	16	79
400 (tetrapl.)	35	15	13	19	16	65

Tab. 18 Übersicht über die nach Röntgen-Bestrahlung beobachteten Häufigkeiten der verschiedenen TSB

Dosis 100 kr. Zur Ermittlung der Anteile der TSB mit vitalen Zellen (Spalte 5 u. 6) wurde der Anteil der makroskopisch bestimmten Überlebenden entsprechend den Werten in Spalte 3 u. 4 aufgeteilt.

Stamm	Zahl der vitalen (v) und der avitalen Zellen (a) und in () Anteil der avitalen [%] in der ... Generation									
	I		II		III		IV		V	
	v	a	v	a	v	a	v	a	v	a
A 103	5	4 (45)	8	2 (25)	15	1 (7)	27	1 (4)	46	1 (2)
H 168	55	7 (11)	86	15 (15)	141	9 (6)	255	10 (3,8)	397	17 (4,1)
400	21	5 (19)	32	10 (24)	56	4 (6,7)	84	10 (11)	139	8 (5,5)

Tab. 19 Häufigkeit avitaler Zellen in TSB nach Rö-Bestrahlung

Es wurden nur TSB ausgewertet, die mindestens eine avitale Zelle hatten. Alle Anteile sind auf die in der betreffenden Generation vorhandenen vital und avitalen Zellen bezogen, wobei Restteilungen der avitalen unberücksichtigt blieben (siehe 3.4.2.).

3.4.4. Diskussion

Die Befunde über das Auftreten von avitalen Zellen[1] in makroskopischen Kolonien (Überlebenden) lassen sich unter zwei Gesichtspunkten dikutieren. Zum einen kann man diese Beobachtung als nicht größenordnungsgemäße Störung des Kriteriums "Koloniebildungsfähigkeit = Freiheit von letal wirkenden Zuständen" ansehen. Zum anderen ist es möglich, daß gerade das Auftreten avitaler Zellen Ausdruck eines typischen Inaktivierungsprozesses ist, der bei den bestrahlten Zellen Restteilungen zuläßt[2], bei denen unter bestimmten Bedingun-

---

1) Zur Definition "avital" siehe Fußnote Seite 112.
2) Restteilungen sind bisher bei zahlreichen untersuchten Mikroorganismen beobachtet worden (siehe z.B. SWANN 1962 bei Schizosaccharomyces, JACOBSON 1962 bei Chlamydomonanas), ohne daß eine befriedigende Erklärung dafür gefunden wurde.

gen entweder nur avitale oder aber vitale und avitale Zellen entstehen. Damit wäre es denkbar, daß sich aus den Beobachtungen der TSB allgemeinere Rückschlüsse auf den Mechanismus der Inaktivierung ziehen lassen.
Vergleicht man die in den Tab. 16 u. 18 angegebenen Werte für die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Häufigkeit des Auftretens von TSB (bzw. Kolonien) ohne avitale Zellen, so erkennt man unabhängig vom Ploidiegrad der untersuchten Saccharomyces-Stämme, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit ca. zwei- bis dreimal höher ist als die Wahrscheinlichkeit, mit der TSB ohne avitale Zellen auftreten. Dieses Verhältnis mag noch etwas verschoben werden durch in späteren Generationen beobachtbare avitale Zellen, jedoch ist - bedingt durch die in Tab. 17 u. 19 erkennbare Abnahme des Anteils avitaler Zellen mit der Zahl der Generation - keine größenordnugsmäßige Veränderung zu erwarten. Daher erscheinen Treffer- bzw. Treffbereichs-theoretische Überlegungen, solange sie nur zu größenordnungsmäßigen Abschätzungen führen, weiterhin unter Benutzung des Kriteriums "Koloniebildungsfähigkeit = Freiheit von letal wirkenden Zuständen" bei Saccharomyces gerechtfertigt.
Die Aufklärung des Mechanismus der zum Auftreten avitaler Zellen in sonst vitalen Kolonien führt, ist anhand des vorliegenden Materials nicht möglich. Dafür wäre eine wesentlich umfangreichere Untersuchung nötig, die sich insbesondere auf weitgehend homozygote und isogene Saccharomyces-Stämme unterschiedlichen Ploidiegrades und über mehrere Dosen erstrecken müßte. Hier erscheint es nur sinnvoll, einige plausible Mechanismen zu diskutieren, die durch weitere Untersuchungen zu erhärten oder zu verwerfen sind.

Stellt man die in den Tab. 17 u. 19 angegebenen Anteile (A) der pro Generation in TSB mit avitalen Zellen auftretenden avitalen Zellen (bezogen auf die Zahl der avitalen und vitalen Zellen[1]) als Funktion der Generation (x) graphisch dar, und berücksichtigt man, daß alle nur Restteilungen

---

1) Zur Berechnung dieses Quotienten siehe 3.4.2.

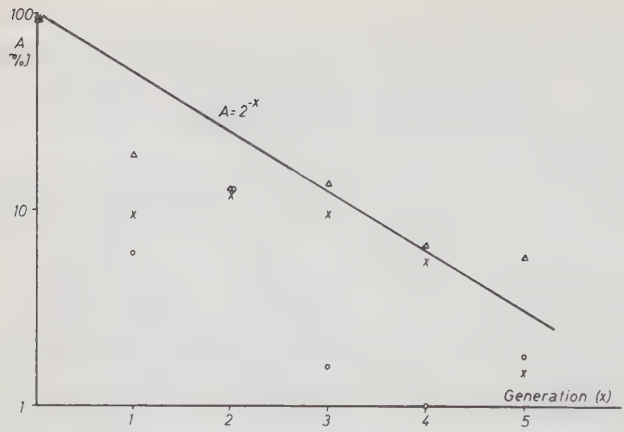


Abb. 32

Häufigkeit des Auftretens avitaler Zellen pro Generation in TSB mit avitalen Zellen als Funktion der Generation, nach UV

Die Werte A sind aus der Tab. 17 Spalten 3,5,7,9,11, eingeklammerte Werte, entnommen.

o = A 103 [D = 5']; x = H 168, Δ = 400 [D = 10'].

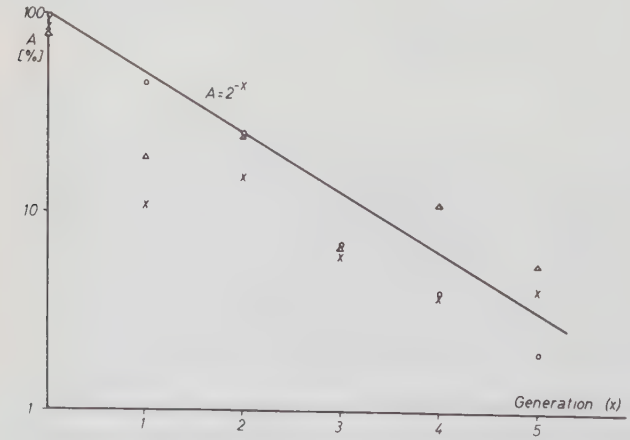


Abb. 33

Häufigkeit des Auftretens avitaler Zellen pro Generation in TSB mit avitalen Zellen als Funktion der Generation, nach Röntgenbestrahlung

Die Werte A sind aus der Tab. 19 Spalten 3,5,7,9,11, eingeklammerte Werte, entnommen.

o = A 103 ; x = H 168 ; Δ = 400 [100 kr]

durchführenden Zellen als avital in der nullten Generation zu zählen sind, so ergeben sich die Abb. 32 u. 33. Während für Röntgenstrahlen die Werte aller drei Stämme mit einem Kurvenverlauf der Form $A = 2^{-x}$ (mit x = Generation) nicht unverträglich sind, zeigen die Werte für UV und insbesondere für den Haplonten Abweichungen von dieser Kurve. - Die Abweichungen der Punkte der ersten Generation in beiden Abbildungen sind erklärbar, wenn man berücksichtigt, daß bei der verwendeten Technik von Zellen,deren erste Knospe inaktiv war (50 % avitale in der 1. Generation), und die zusätzlich möglicherweise eine starke Teilungsverzögerung hatten, keine TSB angelegt wurden, da die erste Teilung erst nach der Beobachtungszeit auftrat.
Die Möglichkeit, die nach Röntgenbestrahlung erhaltenen Werte der Abb. 33 als Punkte einer Kurve $A = 2^{-x}$ zu interpretieren, läßt vermuten, daß die zur Inaktivierung führenden veränderten Zellstrukturen oder Prozesse von Generation zu Generation um den Faktor 2 "verdünnt" werden. Berücksichtigt man die bei der Anfertigung aller TSB stets gemachte Beobachtung, daß die Tochterzellen häufig, vor allem bei dem Haplonten,kleiner als die Mutterzellen sind, so sollten sich Schäden primär nicht genetischer Art etwas stärker als nach 2^{-x} verdünnen. Diese Tendenz läßt sich auch für den Haplonten erkennen.
Gegen primär im Genom vorhandene Schäden als Ursache der Weitergabe der verspätet wirksamen Letaleffekte spricht, daß sich das Genom im allgemeinen identisch redupliziert, und man also keine Verdünnung von genetischen Schäden erwarten sollte. Es ist nicht auszuschließen, daß z.B. auch ein Röntgenstrahlen-geschädigter DNS-Strang als Matrix sowohl für eine defekte als auch für eine aktive DNS dienen kann, wodurch sich ebenfalls eine Verdünnung ergeben würde. - Denkbar ist auch, daß es sich um genetische Schäden handelt, die mit einer nach 2^{-x} abnehmenden Wahrscheinlichkeit fixiert werden. - Inwieweit auch plasmatische Schäden direkt oder nach Inkorporation in das Genom zur Bildung avitaler Zellen führen, bleibt ungeklärt.

Auffällig ist, daß sich die verschiedenen Ploidieklassen in der Abhängigkeit von A von x für Röntgenstrahlen wenig unterscheiden. Dies läßt möglicherweise darauf schließen, daß es sich bei der Entstehung röntgeninduzierter avitaler Zellen - und damit bei der Inaktivierung - um Prozesse handelt, die im Anschluß an die Primärprozesse in einer ploidiegradunabhängigen Weise ablaufen.
Ähnliche Überlegungen wie für die Entstehung von TSB bzw. Kolonien mit avitalen Zellen nach Röntgenbestrahlung lassen sich auch für die Ergebnisse nach UV anstellen. Auffällig sind hier die größeren Abweichungen der A-Werte für den Haplonten von der Kurve $A = 2^{-x}$. Es ist nicht auszuschließen, daß Di- und Tetraplonten eine andere Manifestierung von UV-induzierten Strahlenschäden zeigen als Haplonten, was sich möglicherweise auch aus der Ploidiegradabhängigkeit der "Rückmutationsraten" (siehe 3.1.3.) schließen ließ.
Versucht man, die hier mitgeteilten Ergebnisse mit dem von SWANN 1962 bei Schizosaccharomyces nach Röntgenbestrahlung gefundenen Muster für das Auftreten letaler Zellen unter den Nachkommen bestrahlter Zellen quantitativ zu vergleichen, so stößt dies wegen der methodischen Unterschiede auf Schwierigkeiten. Während in dieser Arbeit durch Auseinandernehmen der sich teilenden Zellen das Schicksal jeder Zelle, die in der 5. Generation aus der ursprünglichen Zelle entstanden ist, kontrolliert wurde, erhält SWANN durch die Auswertung von Reihenphotographien der TSB nur Information, wie sich die Zellen bis zur Zeit der 5. bzw. 6. oder maximal 7. Generation verhalten. Es ist mit seiner Technik nicht möglich, eine stark teilungsverzögerte Zelle in dem später vorhandenen Haufen von Zellen als vital oder letal zu klassifizieren und zu entscheiden, ob eine Zelle vital oder avital mit hoher Restteilung ist.
Dennoch ergeben sich prinzipielle Ähnlichkeiten, es treten die gleichen Typen von TSB auf, der Anteil der avitalen Zellen nimmt mit steigender Generation stark ab, und es werden ebenfalls Restteilungen der avitalen Zellen beobachtet.

Faßt man Ergebnisse und Diskussion über das Auftreten avitaler Zellen in den TSB, die zu makroskopischen Kolonien führen, zusammen, so scheinen folgende Punkte von Wichtigkeit:

a) Nach Bestrahlung gibt es 2 Typen von "überlebenden" Zellen; solche, die vitale und avitale Nachkommen haben und diejenigen, die - zumindest in den ersten fünf Generationen - ausschließlich vitale Nachkommen bilden. Der Anteil der letzteren ist nicht größenordnungsmäßig kleiner als die Überlebenswahrscheinlichkeit.

b) Die Abnahme der Häufigkeit von avitalen Zellen pro Generation mit den Generationen ist bis auf den Haplonten nach UV mit einem Gesetz $A = 2^{-x}$ verträglich und läßt vermuten, daß strahleninduzierte letal wirkende Substanzen oder Störungen in die Nachkommen der bestrahlten Zellen übertragen und dort manifestiert werden. Tritt diese Manifestierung in 100 % der Zellen auf, die aus einer bestrahlten Zelle entstehen, so beobachtet man nur Restteilungen. Wird in einigen Zellen der Schaden repariert bzw. nicht manifestiert, so ergeben sich Kolonien mit avitalen Zellen. Werden schließlich in allen Nachkommen einer bestrahlten Zelle vorhandene Schäden nicht manifestiert, oder enthält sie gar keine Schäden, so kommt es zur Ausbildung einer rein vitalen Kolonie.

c) Welcher Art die manifestierbaren Schäden sind, muß bisher ungeklärt bleiben. Die beobachtete Verdünnung macht Beteiligung plasmatischer Schäden, die erst nach mehreren Teilungen zur Inaktivierung führen, recht plausibel. Daneben sind auch andere Erklärungen, wie Zunahme von Aneuploidien im Genom der Zellen der späteren Generationen oder die Manifestierung von letal wirkenden Genomveränderungen mit einer nach $A = 2^{-x}$ abnehmenden Wahrscheinlichkeit in Zellen späterer Generationen denkbar.

4. Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zum Problem der Strahlenwirkung auf das Genom liefern und insbesondere dazu beitragen, das von STEIN u. LASKOWSKI 1958 u. 1960 vorgeschlagene Modell zur Deutung der Ploidiegradabhängigkeit von Saccharomyces zu erweitern. Insbesondere sollte versucht werden, Argumente für oder gegen die zur Aufstellung dieses mathematischen Modells der Inaktivierung nötigen Voraussetzungen zu finden. - Im folgenden wird diskutiert, inwieweit das 1960 in Erweiterung wesentlich einfacherer Vorstellungen aufgebaute Modell (Näheres siehe LASKOWSKI 1960a) durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt wird, und ob modifizierte Vorstellungen über die Inaktivierung von Saccharomyces denkbar sind. Hierbei werden die aus den Diskussionen 3.1.2.3., 3.1.3.3., 3.2.2., 3.3.3. und 3.4.4. resultierenden Argumentationen im Hinblick auf die Strahleninaktivierung zusammenfassend diskutiert.

4.1. Diskussion einiger Ansätze und Ergebnisse zur Überprüfung bestimmter Voraussetzungen des von STEIN u. LASKOWSKI entworfenen Modells zur Deutung der Röntgen- und UV-Inaktivierung von Saccharomyces

Anschließend an die in 1.2. erörterten Probleme und unter Verwendung der in 3. mitgeteilten experimentellen Ergebnisse ergibt sich für die Gültigkeit der von STEIN u. LASKOWSKI 1958 und 1960 unter vollem Vorbehalt gemachten Voraussetzungen zur Aufstellung eines mathematischen Modells für die Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung von Saccharomyces folgendes Bild:

Zu Voraussetzung a) Das Kriterium "Zellen, die makroskopische Kolonien bilden, sind frei von letal wirkenden Zuständen" ist für größenordnungsmäßige Abschätzungen brauchbar. Die Ergebnisse der Teilungsstammbäume (3.4.) lassen jedoch erkennen, daß nach Röntgen-und UV-Bestrahlung auch in makroskopischen Kolonien Zellen auftreten, die keine vitalen Nachkommen liefern. Vernachlässigt man die Anisogenie der

drei untersuchten Stämme der Ploidieklassen p = 1, 2 u. 4, als möglicherweise nicht ausschlaggebend, so ist insbesondere die Ploidiegradabhängigkeit des Anteils der TSB mit avitalen Zellen nach einer einheitlichen Röntgendosis (Tab. 18, 19 in 3.4.3.) ein wichtiger Hinweis, daß für eine genauere Analyse der Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung das Kriterium der makroskopischen Koloniebildung als Indiz für die Freiheit von letalen Zuständen nicht ausreicht.

Die Ergebnisse der TSB weisen darauf hin, daß es in bestrahlten Zellen und deren Nachkommen zahlreiche vom Primärprozeß zeitlich und möglicherweise auch örtlich getrennte Wirkungen gibt, die zur Inaktivierung führen. Die Entscheidung, ob sich eine (Saccharomyces-) Zelle unbegrenzt teilen kann oder nicht, muß nicht unmittelbar während oder nach der Bestrahlung fallen, sie ist vielmehr erst das Ergebnis komplizierter Manifestierungs- oder Segregationsmechanismen, die in den ersten Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zelle ablaufen. Die Vorstellung des örtlich und zeitlich indirekten aber doch mittelbaren letalen "Treffers" (siehe z.B. DESSAUER u. SOMMERMEYER 1964) muß erweitert werden durch eine sich in den beobachteten Fällen über mehrere Generationen erstreckende Kette von biochemischen und/oder strukturellen Änderungen, deren Endglied erst mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Inaktivierung führt.

Zu Voraussetzung c) Es erwies sich, daß die Mutationsraten, mit denen pro Gen bzw. pro Chromosomensatz bestimmte "Rückmutationen" nach Röntgenbestrahlung oder UV auftreten, nur bedingt unabhängig vom Ploidiegrad der bestrahlten Zellen sind (3.1.). Für Röntgenstrahlen ergibt sich eine Konstanz der auf das Gen bzw. den Chromosomensatz bezogenen Mutationsraten, wenn man Haplonten und Diplonten betrachtet, für UV zeigte die eine untersuchte "Rückmutation" auch für diese Stämme nur in bestimmten Dosisbereichen eine Konstanz.

Zieht man zum Vergleich auch tri- und tetraploide Stämme heran, so ergeben sich nach Röntgenstrahlen kleine und nach UV erhebliche Abweichungen von einer Konstanz der "Rückmu-

tationsrate" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz. Es wurden Hinweise gefunden, daß diese Inkonstanz möglicherweise nicht das Ergebnis eines genetischen Nichtausgrägens vorhandener Mutationen ist, sondern die Ursache in einer echten Inkonstanz der Raten (pro Gen bzw. pro Chromosomensatz) hat, mit denen auch in fast isogenen und homozygoten Stämmen der Ploidieklassen p = 1 bis 4 Mutationen als Ergebnis einer auf die Bestrahlung folgenden Kette von biochemischen Prozessen entstehen.
Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von ARMAN und ARDASCHNIKOW 1964 für "Rückmutationsraten" in haploiden und diploiden Saccharomyces-Stämmen mitgeteilten Ploidiegradabhängigkeit. Sie stehen nicht im Einklang mit cytologischen Befunden über die Auslösung von bestimmten Chromosomen-Anomalien durch ionisierende Strahlen und UV in Pflanzenzellen unterschiedlichen Ploidiegrades, wo stets eine Konstanz der Raten pro Chromosom bzw. pro Chromosomensatz gefunden wurde (Näheres dazu siehe 4.2. und Tab. 20). Dieser Widerspruch kann aus dem möglicherweise unterschiedlichen Mechanismen der Induktion und/oder der Struktur von "Rückmutationen" und Chromosomenmutationen erklärbar sein.

Wenn man aus den Ergebnissen der "Rückmutationsexperimente" oder den cytologischen Untersuchungen Rückschlüsse auf die Gültigkeit der von STEIN und LASKOWSKI 1960 gemachten Annahme einer Ploidiegradunabhängigkeit von t, der mittleren Mutationsrate für die Auslösung rezessiv letal wirkender Mutationen,und (1 - W), der mittleren Rate für die Auslösung von dominant wirkenden Veränderungen, ziehen will, so müßte zunächst geklärt werden, welche Prozesse sich aufgrund ihrer strukturellen oder molekularen Ähnlichkeit vergleichen lassen. - Daß es rezessive Letalmutationen gibt, die strukturell den "Rückmutationen" ähnlich sind, scheint nach den Untersuchungen von z.B. de SERRES 1963 u. 1964 an Neurospora crassa auch für Saccharomyces hoch wahrscheinlich. Inwieweit diese Klasse der Mutationen den entscheidenden Beitrag an der Inaktivierung durch rezessiv letale Effekte liefert, bleibt dahingestellt, da es offensichtlich rezes-

siv letal wirkende Genom-Veränderungen gibt (LASKOWSKI und HAEFNER 1963), die im Vergleich zu den "Rückmutationen" mit zwei bis drei Zehnerpotenzen höheren Raten (LASKOWSKI u. HAEFNER 1964, HAEFNER 1964a) induzierbar sind. Es erscheint nicht unplausibel anzunehmen, daß diese mit hohen Raten auftretenden Letalmutationen sich von den von de SERRES beschriebenen strukturell unterscheiden.
Aus den vorliegenden Untersuchungen kann daher nur gefolgert werden, daß eine Ploidiegradabhängigkeit von t - und zwar insbesondere für höhere Ploidiegrade und UV - anzusetzen ist, wenn die Inaktivierung durch rezessiv letale Effekte bevorzugt auf die Wirkung von den "Rückmutationen" vergleichbaren genetischen Veränderungen zurückgeht und die möglicherweise andersartigen "hochmutablen" Strukturveränderungen in ihrer Wirkung zurücktreten; dies wäre möglich, wenn es nur wenige derart mutable Strukturen gibt.
Handelt es sich bei den dominant wirkenden Letalmutationen um Chromosomenmutationen, so ist eine Konstanz der Mutationsraten auf Grund der cytologischen Befunde wahrscheinlich, sind die dominant wirkenden Veränderungen strukturell den "Rückmutationen" ähnlich, so erscheint die Annahme einer Konstanz von (1 - W) insbesondere für UV und für Stämme höheren Ploidiegrades auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kaum gerechtfertigt.
Berücksichtigt man, daß die "Rückmutationsraten" pro Gen bzw. pro Chromosomensatz die Tendenz haben, mit steigendem p abzunehmen, und daß der Anteil der Teilungsstammbäume ohne avitale Zellen vom Haplonten zum Tetraplonten - bezogen auf die gleiche Dosis - zunimmt (3.4.4.), so ist es denkbar, daß Di- und Polyplonten gegenüber Haplonten, bezogen auf die Zelleinheit, prinzipiell bezüglich der Inaktivierung strahlenresistenter sind[1].

---

1) Bei anderen Organismen und in Zellkulturen findet man ebenfalls im allgemeinen eine mit dem Ploidiegrad steigende Resistenz gegenüber Inaktivierung durch ionisierende Strahlen (z.B. BERRY 1963, REINBERGS 1962, BHASKARAN und SWAMINATHAN 1961, TILL 1961, REVÉSZ u. NORMAN 1960, SPARROW 1958).

Zu Voraussetzung d) Die zur Abspaltung der Inaktivierung durch plasmatische Schäden gemachte Annahme, daß die und nur die Zellen plasmatisch geschädigt sind, die nach der Bestrahlung als Einzelzelle liegenbleiben, erweist sich aus folgenden Gründen als recht problematisch:
a) Eine Korrelation zwischen Häufigkeit der Nichteinzelzellen und Atmungs- bzw. Gärungsaktivität besteht für UV überhaupt nicht und deutet sich für Röntgenstrahlen nur bei sehr hohen Dosen an (HEMPEL u. LASKOWSKI 1964). - b) Nach Bestrahlung von z.B. Diplonten bilden die Überlebenden gut sporulationsfähige Kulturen, die in der Tetradenanalyse in zahlreichen Tetraden letale Sporen liefern, also rezessiv letal wirkende Gene enthalten. Diese letalen Sporen führen häufig k e i n e Restteilungen durch (siehe 3.2.2.d). Da sie jedoch offensichtlich durch genetisch segregierende Veränderungen, also nicht durch plasmatische Schäden inaktiviert werden, scheint es zumindest Ausnahmen von dem von STEIN und LASKOWSKI gemachten Ansatz zu geben.
Daß auch Saccharomyces-Zellen, deren plasmatische Schäden letztlich zur Inaktivierung führen, Knospen bilden können, erscheint plausibel, wenn man z.B. annimmt, daß das die DNS-Reduplikation steuernde Enzymsystem durch die Bestrahlung zerstört ist. Da nach Bestrahlung Knospenbildung und Kernteilung nicht korreliert zu sein brauchen (MORTIMER 1952, MEISSEL 1956), ist trotz des Plasmaschadens zumindest eine Knospenbildung denkbar.

Zu Voraussetzung e) Falls die in 3.2. mitgeteilten unerwarteten Aufspaltungen in den Tetradenanalysen bestrahlter Haplonten und Diplonten nicht durch eine nicht 100 %ige Penetranz der rezessiv letal wirkenden Mutationen oder durch Heterogenität der untersuchten Kulturen bedingt sind (siehe 3.2.2. a), müßten in einem Ansatz für die Deutung der Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung auch Glieder aufgenommen werden, die eine Inaktivierung durch mehrere, jeweils allein im hemi- bzw. homozygoten Zustand nicht inaktivierend wirkende Mutationen berücksichtigen.

Für UV lassen auch die nicht exponentiellen Inaktivierungskurven der Haplonten die Mitwirkung solcher mehrtreffbereichsartigen Wirkungen möglich erscheinen. Für Röntgenstrahlen ergeben sich für Haplonten im allgemeinen exponentielle Inaktivierungskurven; ob diese Kinetik jedoch gegen eine Beteiligung derartiger Mutationen sprechen muß, hängt von der speziellen Dosisabhängigkeit der Mutationsraten der einzelnen Loci ab (siehe auch Fußnote Seite 69).
Faßt man die Diskussion über die vier untersuchten Voraussetzungen zusammen, so muß festgestellt werden, daß es experimentelle Befunde gibt, die die Verwendbarkeit bestimmter Voraussetzungen zum Aufbau eines verfeinerten mathematischen Modells der Inaktivierung von Saccharomyces nicht brauchbar erscheinen lassen. Dies gilt insbesondere für das zur Abtrennung plasmatischer Schäden eingeführte Kriterium der Einzelzellen und die Konstanz von Mutationsraten pro Gen bzw. Chromosomensatz bei struktureller Ähnlichkeit von rezessiv letalen und "Rück"-Mutationen. Die aus den hier vorgelegten Untersuchungen ausgeklammerte Voraussetzung b) (Fehlen von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen zur Inaktivierung führenden Prozessen) bleibt weiterhin zu überprüfen.

4.2. Derzeitiger Stand der modellmäßigen Erklärung der Strahlen-Inaktivierung von Saccharomyces

Nachdem im vorigen Abschnitt erörtert wurde, welche Schwierigkeiten sich aus der Überprüfung der für ein mathematisches Modell nötigen Voraussetzungen ergeben, soll hier versucht werden, unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Ergebnisse ein etwas modifiziertes, mehr qualitatives Bild der Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung von Saccharomyces zu geben. Ein quantitatives Modell kann, bedingt durch die Vielzahl der auf der einen Seite wesentlichen Parameter und dem auf der anderen Seite vorhandenen Mangel an entsprechenden unabhängigen Informationen, noch nicht vorgelegt werden. - STEIN u. LASKOWSKI 1958 und 1960 gelang es, durch von ihnen bewußt und unter

vollem Vorbehalt eingeführte Voraussetzungen und Vereinfachungen die Zahl der Unbekannten gleich der Zahl der verfügbaren Informationen zu halten (ausführlich dargelegt in LASKOWSKI 1960a). Dieser heuristisch wertvolle Ansatz kann jedoch für eine vertiefte Analyse nicht ohne nötige Erweiterungen weiter benutzt werden[1].

a) Zur Inaktivierung durch Röntgenstrahlen: Berücksichtigt man die zahlreichen bei Saccharomyces und an anderen Organismen durchgeführten Untersuchungen über die Wirkung ionisierender Strahlen auf Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten in vivo und in vitro (siehe dazu neben den in l.l. zitierten Arbeiten GONZALES u. BARROW 1956, BAIR u. STANNARD 1955, BRUCE u. STANNARD 1958 und LEE, RAJEWSKY u. PAULY 1964), in denen sich im allgemeinen in vitro schon bei kleineren Dosen, in vivo jedoch erst bei sehr hohen erkennbare Effekte ergaben, so erscheint es plausibel anzunehmen, daß die Röntgeninaktivierung von Saccharomyces in dem interessierenden Dosisbereich nicht auf die Schädigung des enzymatischen Apparats sondern auf direkte oder indirekte Veränderungen von Struktur und/oder Funktion des genetischen Materials zurückgeht. Dabei ist es wahrscheinlich, wie z.B. bei Saccharomyces die vorläufigen Ergebnisse der Teilungsstammbäume vermuten lassen, daß die im Cytoplasma gesetzten Primärveränderungen über indirekte Wirkungen auf das Genom einen Beitrag zur Inaktivierung liefern.
Über die Struktur dieser genetischen Veränderungen ist bisher bei Saccharomyces nichts bekannt.–Zieht man die Ergebnisse von de SERRES 1963 u. 1964 an Neurospora crassa, von KIMBALL u. PERDUE 1962 an Paramecium und von KÄFER u. CHEN 1964 an Aspergillus vergleichend hinzu, so ist es wahrscheinlich, daß Punktmutationen zur Inaktivierung führen. Da derartige Punktmutationen mit Raten auftreten sollten, die von

---

1) Inwieweit die Interpretation von Inaktivierungskurven mit der ihr zugrunde liegenden Definition der "Überlebenden" ausreicht den Inaktivierungsprozess zu interpretieren und ob nicht aus den Beobachtungen der TSB resultierende neue Kriterien verwendet werden sollten, sei hier nicht weiter diskutiert.

der Größenordnung der "Rückmutationsraten" sind, müßten zur Erklärung der gesamten Inaktivierungsraten sehr zahlreiche Loci mutieren. - Gegen diese Interpretation der Inaktivierung sprechen die in dieser Arbeit nicht gefundene Korrelation zwischen Inaktivierung und "Rückmutabilität" sowie die Ergebnisse von MOUSTACCHI und MARCOVICH 1962, die keinen Einfluß der die Röntgeninaktivierung von Haplonten stark veränderten S_i-Gene auf "Rückmutationsraten" gefunden haben.

Die Auslösung von letal wirkenden Veränderungen mit hohen Raten (LASKOWSKI u. HAEFNER 1963) läßt vermuten, daß es neben den beim Inaktivierungsprozess möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielenden Mutationen mit kleinen Auslösewahrscheinlichkeiten noch andere strukturell bisher nicht aufgeklärte genetische Veränderungen gibt. Ob diese ausreichen die Inaktivierung zu erklären muß dahingestellt bleiben, bis geklärt ist, wieviele derartig hochmutable Strukturen im Genom von Saccharomyces existieren.
Über Chromosomenaberrationen als strukturelle Ursache der Röntgeninaktivierung wurde bei Saccharomyces bisher in der Literatur nicht berichtet[1]. Sie erscheinen jedoch recht wahrscheinlich, wenn man sich z.B. die Auslösewahrscheinlichkeiten für Isochromatidbrüche in Pflanzenzellen ansieht (Tab. 20). Will man für Saccharomyces nicht eine gänzlich andere Chromosomenstruktur und -empfindlichkeit postulieren, so muß man bei 5 kr für Saccharomyces bei einem Chromosomenbestand von ca. 15, wenn man die kleinsten in Tab. 20 angegebenen Wert zugrunde legt, mit $0{,}022 \cdot 15 = 0{,}33$ Isochromatidbrüchen pro Chromosomensatz rechnen. Führen diese z.B. beim Haplonten zur Inaktivierung, so sieht man, daß bereits eine einzige von zahlreichen möglichen Chromosomenaberrationen einen wesentlichen Beitrag zur Inaktivierung liefert (bei Haplonten und dieser Dosis $T = 1 - \ddot{U} \approx 0{,}99$).

---

1) MAGNI u. MORTIMER (nach persönlicher Mitteilung) fanden trotz ausführlicher Untersuchungen im 5. Chromosom von Saccharomyces nach Röntgenbestrahlung praktisch keine Deletionen.

Objekt	Bestrahlter bzw. ausgewerteter Teil	Isochromatiden-bzw. Chromosomenbruchhäufigkeit pro Chromosom	Autoren
Tradescantia	Pollen/Microsporen	0,28[1)]	NEARY et al. 1963
Viscia faber	Samen/Keimling	0,21[2)]	WOLFF 1960
Weizen diploid	Samen/Keimlingsspitze	0,026	BHASKARAN u. SWAMINATHAN 1962
tetraploid		0,022	
hexaploid		0,023	
Gerste diploid	Samen/Keimlingsspitze	0,035	BHASKARAN u. SWAMINATHAN 1962
tetraploid		0,034	

Tab. 20 Beispiele für die Häufigkeiten des Auftretens von Isochromatiden- bzw. Chromosomenbrüchen in Pflanzenzellen nach einer Dosis von 5 kr.

Bei dieser relativ hohen Dosis wurden nur wenige Untersuchungen angestellt, da bereits für viele Systeme wesentlich kleinere Dosen zahlreiche Chromosomenaberationen ergeben.

Berücksichtigt man, daß nach den in 3.3. Tab. 11 mitgeteilten Ergebnissen z.B. bei 90 kr in einem Diplonten pro 1 % meiotischer Austauschhäufigkeit zwischen den Chromatiden oder Chromosomen Austauschprozesse mit Häufigkeiten von ca. 0,05 % auftreten, und schätzt man die Länge des Genoms von Saccharomyces auf 15·2·50 = 1500 %[3)] meiotischer Austausch-

---

1) Extrapoliert aus Kurven die bis ca. 3 kr aufgenommen wurden.
2) Linear extrapoliert aus einer Dosis von 0,6 kr, umgerechnet aus Doppelchromosomenbruchhäufigkeiten.
3) Saccharomyces hat mindestens 15 Chromosomen (Yeast Genetics Conference 1961); für diese Abschätzung kann man annehmen, daß jedes Chromosom metazentrisch ist, und die beiden Chromosomenarme je eine Länge von 50 % meiotischer Austauschhäufigkeit haben.

häufigkeit ab, so ergibt sich, daß bei 90 kr bereits in $0{,}0005 \cdot 1500 \approx 0{,}8$, also ca. 80 % aller Zellen ein Austauschprozess auftritt. Bei 200 kr besitzt bereits jede Zelle mindestens einen solchen Austausch. Da die angegebenen Häufigkeiten für zu vitalen Zellen führende, vermutlich reziproke Austauschprozesse gelten, ist es recht wahrscheinlich, daß Anomalien wie Isochromatidenverschmelzungen mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit auftreten und damit einen Beitrag zur Inaktivierung diploider Zellen liefern.
Daß Chromosomenbrüche in Ermangelung geeigneter cytologischer Methoden auch genetisch nicht nachgewiesen wurden, kann darauf zurückzuführen sein, daß die Fusion von Bruchstücken nach der Bestrahlung sehr häufig ist und dadurch zahlreiche Brücken gebildet werden, die direkt zur Inaktivierung führen[1].
Sieht man von den Strukturfragen ab und klassifiziert die letal wirkenden Veränderungen formal in rezessive oder dominante "Letalmutationen" (MORTIMER 1958), so bleibt zu klären, welche Anteile diese Mutationen an der Inaktivierung haben. - Daß die rezessiven Letalmutationen fast ausschließlich die Inaktivierung der Haplonten bewirken, wurde von STEIN und LASKOWSKI gefolgert und wäre anhand der Ergebnisse von MORTIMER 1961 und MAGNI 1959 unwahrscheinlich, wenn man unter Berücksichtigung der strengen Definition von MORTIMER 1961 nur die jeweils allein rezessiv letal wirkenden Mutationen betrachtet (siehe 3.2.2.). Berücksichtigt man darüber hinaus die vor allem nach Bestrahlung eines Haplonten gehäuft auftretenden, möglicherweise polygen letal wirkenden Mutationen (siehe 3.2.1.), so erscheint eine zur Erklärung der Inaktivierung der Haplonten ausreichende Zahl rezessiv letaler Veränderungen vorhanden zu sein.
Damit würde sich die Annahme eines weiteren unbekannten Prozesses für die Inaktivierung der Haplonten (MORTIMER 1961) erübrigen. - Auf der anderen Seite wäre es nötig, in Er-

---

1) In Escherichia coli fand MARCOVICH 1961 nach hohen Röntgendosen ebenfalls keine genetisch erkennbaren Translokationen.

weiterung des nur die Wirkung von normal segregierenden, einzelnen rezessiv letal wirkenden Genen beschreibenden Ansatzes

$$\ddot{U}_r = (1 - t^p)^m \qquad (21)$$

(STEIN u. LASKOWSKI 1960) einen die polygene Wirkung rezessiver "Semiletalmutationen" mitberücksichtigenden Ansatz zu machen. Von Bedeutung ist dieser nur für p = 1, da die Di- und Polyplonten gegenüber der kombinierten Wirkung mehrerer rezessiver "Semiletalmutationen" ebenso geschützt sind wie gegen die Wirkung einzeln rezessiv letal wirkender Mutationen. Für den Haplonten (p = 1) muß man, wenn man vereinfachend nur die Wirkung aller Zweierkombinationen berücksichtigt, anstelle von (21) schreiben:

$$\ddot{U}_{rl} = (1 - t)^m \prod_{k,j=1}^{s} (1 - t_k\, t_j) \quad . \qquad (22)$$

s ist die Zahl der insgesamt vorhandenen Loci, die in der beschriebenen Weise mutieren können, t_k und t_j sind die (dosisabhängigen) Raten dieser Loci. Die Multiplikationen sind so auszuführen, daß gemeinsam rezessiv letal wirkende Paare k-j berücksichtigt werden. Setzt man im Sinne einer Mittelwertbildung alle $t_k = t_j = t'$ und nimmt an, daß r rezessiv letal wirkende Kombinationen von jeweils z w e i Genen vorhanden sind, so ist

$$\ddot{U}_{rl} = (1 - t)^m\, (1 - t'^2)^r \quad . \qquad (23)$$

In diesem Modell erscheint der Haplont, wenn man für $p \geq 2$ weiterhin Gl. (21) als richtig ansieht, gegenüber den Di- und Polyplonten sensibler als in dem ursprünglichen Ansatz. Daß heißt, daß bei vorgegebenem Resistenzunterschied zwischen Haplonten und Diplonten, die größere Sensibilität der Haplonten nicht durch große Werte von $t \cdot m$ sondern auch durch große Werte von $t'^2 \cdot r$ gegeben sein kann. Die in 3.2.1. dar-

gestellten Versuche, in denen wenige echt rezessiv letale und zahlreiche semiletale Zustände gefunden wurden, lassen vermuten, daß $t'^2 \cdot r > tm$ ist.

Schließt man sich den in 4.1.c dargelegten Argumenten an, so erscheint es möglicherweise zusätzlich nötig, anstelle von t ein t(p) einzuführen. Ist $t(p) < t$ für $p > 2$, so würde das ebenfalls zu einem größeren Resistenzunterschied zwischen Haplonten und Polyplonten beitragen.

Der Anteil dominant letal wirkender Mutationen an der Inaktivierung von Diplonten sollte nach STEIN und LASKOWSKI 1960 bei kleinen Dosen mindestens 80 % der Inaktivierung ausmachen. OWEN u. MORTIMER 1956 fanden durch direkte Methoden, daß bei ihren Stämmen bei gleichen effektiven Dosen nur ca. 50 % der Inaktivierung auf dominante Mutationen zurückführbar ist. - Kopulationsversuche zwischen bestrahlten Polyplonten und unbestrahlten Zellen, die nach den Folgerungen von STEIN und LASKOWSKI einen sehr hohen Prozentsatz letaler Zygoten ergeben sollten, sind bisher nicht gemacht worden.

Versucht man, aus den von LASKOWSKI 1960 und 1962 für ein weitgehend isogenes und homozygotes System von Saccharomyces-Stämmen der Ploidiegrade p = 1 bis 6 angegebenen Inaktivierungskurven, die Inaktivierung der Stämme der Ploidieklassen p = 3 und 6 durch einen Ansatz $Ü_p = W^p$ mit konstantem W zu beschreiben, so ergeben sich Schwierigkeiten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit des Hexaplonten ist bei z.B. 50 kr nicht $Ü_6 = Ü_3^2$, sondern $Ü_6 = 0{,}14\ Ü_3^2$, bei 100 krad ist $Ü_6 = 0{,}36\ Ü_3^2$ (verglichene Stämme 600 und 313). Ein ähnlicher nicht einem Ansatz W^p gehorchender Zuwachs der Inaktivierung vom Triplonten zum Hexaplonten ergibt sich aus den Werten von MORTIMER 1958 ($Ü_6 = 0{,}4\ Ü_3^2$ bei 25 krad) und MORTIMER 1961 ($Ü_6 \approx 0{,}1\ Ü_3^2$ bei 20 krad). Diese Werte lassen vermuten, daß offensichtlich kompliziertere Mechanismen als rein dominant wirkende Mutationen bei der Inaktivierung von Polyplonten eine Rolle spielen.

Auf im Anschluß an Chromatiden- bzw. Chromosomenbrüche entstehende und stabile Brückenbildungen als Ursache dominant letal wirkender Strahlenschäden wies bereits MORTIMER 1958 hin[1]. Ohne experimentelles Material für Saccharomyces ist es schwer, quantitative Aussagen über die Ploidiegradabhängigkeit solcher möglicherweise die Mitose störenden Einflüsse zu machen. Nimmt man jedoch an, daß die Häufigkeit für Chromosomenbrüche bei kleinen Raten angenähert mit dem Ploidiegrad steigt, so sollte die Häufigkeit, mit der Brükken zwischen homologen oder nicht homologen Chromosomen bzw. Chromatiden auftreten und damit die Inaktivierungswahrscheinlichkeit stärker als nach $1 - W^p$ zunehmen. Dies scheint - wie oben gezeigt - auch wirklich zuzutreffen.
In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die Paarungstypallel-Konstitution einen Einfluß auf die Röntgenresistenz von Diplonten hat (aα-Effekt; MORTIMER 1958, LASKOWSKI 1960). Da nur aα-Diplonten meiotische Prozesse ausführen können, ist es denkbar, daß sie sich auch in ihrem mitotischen Verhalten von den für das Paarungstypallel homozygoten Diplonten unterscheiden und damit vielleicht eine kleinere Häufigkeit von Brückenbildungen und ~~damit~~ eine kleinere Rö-Strahlensensibilität bezüglich der Inaktivierung aufweisen.
Eine einheitliche Gleichung für die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nach Röntgenbestrahlung kann hier nicht neu aufgeschrieben werden, da zunächst noch kritische Experimente über die Gültigkeit der ungestörten Superponierbarkeit der separierten Anteile der Überlebenswahrscheinlichkeit, über die Ploidiegradabhängigkeit von t und zur Klärung, inwieweit die Inaktivierung von Polyplonten nur auf die Wirkung von dominanten Mutationen zurückgeht, gemacht werden müssen.

---

1) Versuche, eine Korrelation zwischen Inaktivierung und Häufigkeit von Chromosomen- und Mitoseanomalien bei in vitro bestrahlten Zellkulturen durchzuführen, wurden z.B. von GREENBLATT 1961 unternommen, führten jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis.

b) Inaktivierung durch ultraviolettes Licht Der Aufbau eines Modells zur Deutung der UV-Inaktivierung von Saccharomyces-Stämmen unterschiedlichen Ploidiegrades wird erschwert durch die hier gegenüber der Wirkung von Röntgenstrahlen noch geringeren Zahl der unabhängigen Informationen.

Von vornherein lassen sich UV-Wirkungen im Cytoplasma nicht ausschließen, da verschiedene Autoren bei relativ geringen Dosen eine Hemmung spezifischer Enzym-Systeme in vivo festgestellt haben (ALDOUS u. STEWART 1952, GIESE 1950, NAKAMURO u. RAMAGE 1962).-Es gibt jedoch keine kritischen Experimente für das von STEIN und LASKOWSKI 1960 angesetzte Kriterium zur Abtrennung der bei UV möglicherweise vorhandenen nicht genetischen Effekte. Die von HEMPEL 1964 durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß sich für UV Anteil von Nichteinzelzellen und Atmungs- bzw. Gärungsaktivität nicht korrelieren lassen.

ALDOUS u. STEWART 1952 fanden für verschiedene Enzyme in Saccharomyces sehr unterschiedliche Aktivitätsminderungen bei relativ kleinen Dosen; es ist zu vermuten, daß das sensibelste Enzymsystem das Ausmaß der Inaktivierung durch Schäden im Cytoplasma bestimmen wird. Dabei muß stets vorausgesetzt werden, daß das betreffende Enzymsystem nicht auf Grund in der DNS vorhandener Information nach der Bestrahlung nachgebildet wird. Diese Nachbildung sollte nach dem in Bakterien festgestellten sehr schnellen Umsatz der messenger-RNS (siehe z.B. GROSS et al. 1961) bald nach der Bestrahlung einsetzen, wenn nicht entweder das gesamte System m-RNS-Ribosomen-Protein geschädigt oder die Bildung der betreffenden m-RNS unmöglich ist.

Die Berücksichtigung plasmatischer Schäden in einem mathematischen Modell müßte diesen komplizierten Sachverhalt, der durch die möglichen Neusynthesen, die sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Enzyme und das Zusammenwirken mehrerer Enzymsysteme gegeben ist, durch Einführung geeigneter Wechselwirkungsglieder mit einbeziehen.

Der Nachweis der Existenz UV-induzierter rezessiv letal wirkender Mutationen konnte zwar erbracht werden[1] die experimentellen Ergebnisse reichen jedoch nicht aus, um den Anteil derartiger Mutationen an der Inaktivierung zu klären.

Entsprechen die bei der Auslösung rezessiver Letalmutationen entstehenden strukturellen Änderungen denen, die für "Rückmutationen" von Bedeutung sind, und hält man die in 3.1.3.1. und die von ARMAN und ARDASCHNIKOW 1964 mitgeteilte Ploidiegradabhängigkeit von "Rückmutationsraten" für repräsentativ für die Ploidiegradabhängigkeit der Raten, mit denen rezessive Letalmutationen ausgelöst werden, so ist es denkbar, daß die Inaktivierung von Diplonten noch teilweise auf die Wirkung rezessiver Letalmutationen zurückgeht. Für eine Klärung dieses Problems ist es nötig, insbesondere die Auslösung von rezessiven Letalmutationen in in der haploiden und diploiden Phase bestrahlten und dann zur Kopulation gebrachten Zellen zu untersuchen.

Versuche zur Bestimmung von Mutationsraten für rezessiv letal wirkende Mutationen (HAEFNER u. LASKOWSKI unveröffentlicht) legen die Vermutung nahe, daß es ähnlich wie für Röntgenstrahlen auch gegenüber UV hoch mutable rezessiv letal wirkende Veränderungen gibt. Eine exakte Bestimmung ist jedoch wegen der schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bisher nicht möglich gewesen.

Unbefriedigend für die Aufstellung eines Modells der UV-Inaktivierung bleibt es, daß der direkte Nachweis der Existenz von UV-induzierten, dominant letal wirkenden Mutationen noch nicht erbracht wurde. - Die formale Interpretation, daß Polyplonten bevorzugt durch dominant wirkende Mutationen inaktiviert werden, ist nicht unplausibel. In weitgehend isogenen und homozygoten Saccharomyces-Stämmen der Ploidiegrade p = 4, 5, 6, bei denen - selbst unter der aus den vorliegenden Untersuchungen möglicherweise nicht zu rechtfertigenden Annahme einer Konstanz der Mutationsraten für

---

1) Nach UV-Bestrahlung von Diplonten erhält man in anschließend durchgeführten Tetradenanalysen ebenfalls letale Sporen (LASKOWSKI u. HAEFNER unveröffentlicht).

rezessiv letal wirkende Mutationen - in Polyplonten eine Inaktivierung durch rezessive Mutationen unwahrscheinlich ist, widersprechen die von LASKOWSKI 1962 ermittelten Inaktivierungswahrscheinlichkeiten nicht einem Ansatz $1 - W^p$. Die Streuung der Meßwerte sowie die unterschiedliche Charakteristik der Kurven erschweren jedoch genauere Aussagen.
Daß auch nach UV mit Chromosomenaberationen zu rechnen ist, muß aus Arbeiten an Pflanzenzellen (siehe z.B. KIRBY-SMITH 1963, SWANSON u. STADLER 1955), an Bakterien (DEMEREC 1960) und an Zellkulturen in vitro (CHU 1963) geschlossen werden.
- Setzt man voraus, daß mitotische Rekombinationsprozesse, wie sie in 3.3. nach UV besprochen wurden, und die Auslösung von Chromosomenaberationen strukturell ähnliche Prozesse sind und mit vergleichbaren Wahrscheinlichkeiten induziert werden, so kann man in analoger Weise wie unter a) abschätzen, daß Chromosomenverschmelzungen nicht mit größenordnungsmäßig kleineren Raten als nach Röntgenbestrahlung auftreten.
Das Fehlen einer Reihe von wichtigen Experimenten über die UV-Wirkung auf Saccharomyces, speziell die Klärung des experimentell direkt bestimmbaren Ausmaßes dominanter und rezessiver Letalmutationen sowie ein geeignetes, experimentell begründetes Kriterium zur Abtrennung der UV-Wirkungen nicht-chromosomaler Natur ermöglicht es augenblicklich nicht, eine neue modellmäßige Interpretation zu geben.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht einen Beitrag zu liefern zum Verständnis der Wirkung von UV und Röntgenstrahlen auf Saccharomyces-Stämme unterschiedlicher Ploidie. Das Material erwies sich als geeignet, das von STEIN und LASKOWSKI 1958 u. 1960 in Erweiterung einfacher Vorstellungen aufgebaute mathematische Modell zur Deutung der Ploidiegradabhängigkeit der Inaktivierung neu zu diskutieren.

Insbesondere wurden vier Gebiete der Strahlenwirkung untersucht; die Diskussion dieser Ergebnisse können in folgender Weise zusammengefaßt werden.

a) Für "Rückmutationsraten" bezogen auf das Gen oder den Chromosomensatz gibt es Abweichungen von der Annahme einer Ploidiegradunabhängigkeit derartiger Raten. Für Röntgenstrahlen traten diese Abweichungen erst bei höheren Ploidiegraden auf und sind verhältnismäßig klein, bei UV war die beobachtete Inkonstanz größenordnungsmäßig größer. - Sind "Rückmutationen" und die Mutationen, die zur Inaktivierung führen strukturell ähnlich, so erscheint es nötig die Ploidiegradabhängigkeit von Mutationsraten pro Gen bzw. pro Chromosomensatz in einem mathematischen Modell zur Deutung der Inaktivierung mitzuberücksichtigen (Näheres siehe 3.1.).

b) Die Auslösung rezessiv letal wirkender Mutationen wurde anhand von Tetradenanalysen bestrahlter Saccharomyces-Zellen näher untersucht. Es ergaben sich Aufspaltungen von vitalen zu letalen Sporen in den Asci die nicht durch die Wirkung jeweils allein rezessiv letaler Veränderungen sondern nur durch die Wirkung mehrerer nur polygen rezessiv letal wirkender Mutationen zu deuten sind. Es gibt gewisse Anhaltspunkte, daß die hohe Strahlenempfindlichkeit der Haplonten bezüglich der Inaktivierung auf Wirkung derartiger polygen wirksamer "Semiletalmutationen" zurückgeht (Näheres siehe 3.2.).

c) Als Beispiel für strahleninduzierte Umkombinationen wurden mitotische Austauschprozesse zwischen Markierungsgenen und den jeweiligen Centromeren im Vergleich zu meio-

tischen Prozessen untersucht. Es ergab sich sowohl für UV wie auch für Röntgenstrahlen ein Anteigen derartiger Austauschprozesse mit dem Abstand des Markierungsgenes vom Centromer und mit der Dosis. - Die berechneten Austauschhäufigkeiten konnten als ein Maß für die strahlenbedingte "Labilität" der bei Saccharomyces cytologisch nicht nachweisbaren chromosomalen Strukturveränderungen in die Diskussion der strukturellen Ursachen der Inaktivierung mit einbezogen werden. (Näheres siehe 3.3. und 4.2.)

d) Die mikromanipulatorische Untersuchung der Nachkommen UV- und Röntgen-bestrahlter Zellen unterschiedlichen Ploidiegrades ergab, daß in den Teilungsprogrammen sowohl vitale als auch letale Zellen auftreten. Das Kriterium 'Überlebende = Freiheit von letal wirkenden Veränderungen' ist nicht eindeutig. - Zellinaktivierung mit und ohne Restteilung und Ausbildung vitaler Kolonien erscheinen damit als unterschiedliche Formen der Manifestierung letal wirkender Veränderungen in den Nachkommen bestrahlter Saccharomyces-Zellen. (Näheres siehe 3.4.)

In einer zusammenfassenden Diskussion wurden die Möglichkeiten der Deutung der Inaktivierung von Saccharomyces unter Berücksichtigung des vorliegenden Materials aufgezeigt. Hierbei wurde deutlich, daß die Auswertung einiger wichtiger kritischer Experimente noch aussteht. Insbesondere handelt es sich dabei um den Nachweis dominant wirkender Genmutationen in Stämmen höheren Ploidiegrades nach UV- und Röntgenbestrahlung, um die Aufklärung der Beteiligung rezessiver Letalmutationen an der UV-Inaktivierung der Haploiden und um die Bereitstellung geeigneter Kriterien zur Abtrennung des Anteils der UV-Inaktivierung durch direkt wirksame Veränderungen im Cytoplasma.

6. Literatur

Aldous, J.G. u. D.K. Stewart: Canad. J. Med. Sci. 30, 561 (1952)

Alper, T., Gillies, N. u. Elkind M.: Nature 186, 1062 (1960)

Arman, J.P. u. Ardaschnikow,S: Dokl. Akad. Nauk.SSSR 154, 212 (1964)

Atwood, K.C. u. Mukai, F.: Amer. Natur. 88, 295 (1954)

Bair, W.J. u. Stannard, J.N.: J. Gen. Physiol. 38, 493 (1955)

Barsukov,V.S., Malinovski, O.V. u. Mitjusova, N.H.: Radiobiogija 3,738 (1963)

Berry, J.R. Rad. Res. 18, 236 (1963)

Bhaskaran, S. u. Swaminathan, M.: Genetica ('s-Grav.) 31, 449 (1960) u. 32, 1 (1961)

Bhaskaran, S. u. Swaminathan, M.: Rad. Botan. 1, 166 (1962)

Birge, A.C. u. Tobias, C.A.: Arch. Bioch. Biophys. 52, 388 (1954)

Bruce, A.K. u. Stannard,J.N.: J. Cell. Comp. Phys. 51, 325 (1958)

Chu, E.H.Y.: XI. Intern. Congr. Gen. 5.84. (1963)

Conger, A.D. u. Johnston,A.H: Nature 178, 271 (1956)

Demerec, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1075 (1960)

Dessauer, F. u. Sommermeyer, K.: Quantenbiologie, Berlin 1964

Fogel, S. u. Hurst, D.D.: Genetics 48, 321 (1963)

Fritz-Niggli, H.: Strahlenf. Strahlenbeh. IV, 198 (1963)

Giese, A.C.: Physiol. Rev. 30, 431 (1950)

Greenblatt, C.L.: Int. J. Rad. Biol. 4, 185 (1961)

Gonzales, E.L. u. Barron,E.S: Bioch. Biophys. Acta 19, 425 (1956)

Greve, E.: Zeitschr. Bot. 17, 435 (1959)

Grigg, G.W.: Nature 169, 98 (1952)

Gross, F., Hiatt, H., Gilbert,W. Kurland, C., Riesebrough, H., Watson, J.: Nature 190, 581 (1961)

Gunther, S.E. u. Kohn, H.J.: J. Bact. 72, 422 (1956)

Haefner, K.: Diplomarbeit FU Berlin (1961)

Haefner, K. u. Laskowski, W.: Zeitschr. Naturf. 18b, 301 (1963)

Haefner, K.: Zeitschr. Naturf. 19b, 451 (1964a)

Haefner, K.: Biophysik 1, 413 (1964)

Haefner, K.: Zeitschr. f. Allg. Mikr. (1964c, im Druck)

Harbers, E.: Die Nukleinsäuren, Stuttgart 1964

Hawthorne, D.C. u. Mortimer, R.K.: Genetics 45, 1085 (1960)

Hempel, S.: Diplomarbeit FU Berlin (1964)

Hempel, S. u. Laskowski, W.: Zeitschr. Naturf. 19b, 929 (1964)

Heslot, H.: Abh. Deutsch. Akad. Wiss. Kl. Med. 1, 193 (1962)

Hill, R. u. Simson, E.: J. Gen. Microbiol. 24, 1 (1961)

Hug, O. u. Kellerer, A.: Biophysik 1, 20 (1963)

Hurst, D.D. u. Fogel, S.: Genetics 50, 435 (1964)

Jacobson, B.S.: Rad. Res. 17, 82 (1962)

James, A.P.: Genetics 44, 1309 (1959)

Kada, T., Brun, E. u. Marcovich, H.: Ann. Inst. Past. 99, 547 (1960)

Kada, T., Doudney, C.O. u. Haas, F.L.: Genetics 45, 995 (1960)

Kaplan, R.W.: In: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin ... 99 (1959)

Käfer, E. u. Chen, T.L.: Cand. J. Gen. Cytol. 6, 58 (1964)

Kaudewitz, F., Moebus, K. u. Kneser, H.: Zeitschr. Naturf. 18b, 245 (1963)

Mc Key, J.: Carylogia 6, Suppl. 2 697 (1954)

Kimball, R.F. u. Perdue, S.W.: Genetics 47, 1595 (1962)

Kirby-Smith, J.S.: In: Wolff, S.: Radiation induced chromosom aberrations New York (1963) S. 203

Korogodin, V.I.: Biophysics 3, 189 (1958)

Laskowski, W. u. Stein, W.: Zeitschr. Naturf. 13b, 305 (1958)

Laskowski, W.:	Zeitschr. Naturf. 15b, 495 (1960)
Laskowski, W. u. Stein, W.:	Zeitschr. Naturf. 15b, 604 (1960)
Laskowski, W.:	Habilitationsschrift, FUB (1960a)
Laskowski, W.:	Zeitschr. Naturf. 17b, 93(1962a)
Laskowski, W.:	Abhand. Deutsch. Akad. Wiss. Kl. Med. 1, 171 (1962b)
Laskowski, W.:	Zentr. Bakt. Par. 184, (Orig.) 251 (1962c)
Laskowski, W. u. Haefner, K.:	Nature 200, 795 (1963)
Laskowski, W. u. Haefner, K.:	Biophysik 1, 407 (1964)
Laskowski, W.:	Umschau 64, 42 (1964)
Laskowski, W. u. Schädel, U.:	Unveröffentlicht
Lea, D.E. u. Coulson, C.A.:	J. Genet. 49, 264 (1949)
Lee, S., Rajewsky B.,Pauly,H.:	Tagung der Deutsch. Ges. f. Biophys. Wien (1964)
Lindegren, C.C., Pittman, D.D. Yuasa, A.:	Trans. Acad. Sci. 21, 524 (1959)
Lindegren, C.C., Bang, Y.N. u. Hirano, T.:	Trans. Acad. Sci., Ser.2, 24, 540 (1962)
Luria, S.E. u. Delbrück, M.:	Genetics 28, 491 (1943)
Magni, G.:	Compt.rend. Lab. Carlsb. Ser. physiol. 26, 273 (1956)
Magni, G.:	Rad. Res. Suppl. 1, 347 (1959)
Magni, G.:	Atti A.G.I. VII°, 1962a
Magni, G.:	Sec. Intern. Congr. Rad. Res. Harrogate 1962b
Magni, G. u. v. Borstel, R.C.:	Genetics 47, 1097 (1962)
Magni, G.:	Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 975 (1963)
Marcovich, H.:	J. Cell. Comp. Physiol. 58, Suppl. 1 , 107 (1961)
Marquardt, H.:	Zeitschr. Naturf. 17b, 689 (1962)
Meissel, M.N.:	Proc. Int. Conf. Peac.Atom. Energ. 11, 227 (1956)
Miller, J.J., Calvin, J. u. Thermaine, J.H.:	Can. J. Microbiol. 1, 560 (1955)
Miller, J.J.:	Can. J. Microbiol. 9, 259(1963)

Mortimer, R.K.:	Univ. Calif. Rad. Lab. Rep. 1922 (1952)
Mortimer, R.K.:	Rad. Res. 2, 361 (1955)
Mortimer, R.K. u. Owen, M.E.:	Rad. Res. 5, 587 (1956)
Mortimer, R.K.:	Rad. Res. 7, 439 (Abstr.)(1957)
Mortimer, R.K.:	Rad. Res. 9, 312 (1958)
Mortimer, R.K. u. Brustad, T.:	Rad. Res. 12, 458 (1960)
Mortimer, R.K.:	Brookh. Symp. Biol. 14, 62 (1961)
Mortimer, R.K. u. v. Borstel, R.C.:	Genetics 48, 1545 (1963)
Moustacchi, E. u. Marcovich, H:	Ann. Inst. Past. 103, 841 (1962)
Moustacchi, E.:	Dissertation Paris 1964
Müntzig, A.:	Hereditas 27, 273 (1942)
Nakamuro, M. u. Ramage, C.M.:	Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 800 (1962)
Natarajan, T., Sikka, S.M. u. Swaminathan, M.S.:	Proc. Intern. Conf. Peac. Atom. Energ. 27, 231 (1958)
Neary, G.J., Savage, J.R.K., Evans, H.J. u. Whittle, J:	Int. J. Rad. Biol. 6, 127 (1963)
Newcombe, H.B.:	Genetics 33, 447 (1948)
Nickel, E.:	Zeitschr. Naturf. 19b, 312 (1964)
Owen, M.E. u. Mortimer, R.K.:	Nature 177, 625 (1956)
Pateman, J.A.:	Zeitschr. Vererb. 91, 380 (1960)
Patrick, M.H., Haynes, R.H. u. Uretz, R.B.:	Rad. Res. 16, (Abstr.) 610 (1962)
Patrick, M.H., Haynes, R.H. u. Uretz, R.B.:	Rad. Res. 21, 144 (1964)
Pittman, D. u. Pedigo, P.R.:	Exp. Cell. Res. 17, 359 (1959)
Reinbergs, E.:	Cand. J. Genet. Cytol. 4, 56 (1962)
Revész, L. u. Norman, U.:	Nature 187, 861 (1960)
Roman, H. u. Jacob, F.:	Compt. Rend. Acad. Sci. 245, 1032 (1957)
Roman, H. u. Jacob, F.:	Cold. Spring. Harb. Symp. 23, 155 (1958)
Roman, H.:	In: Burdette, W.J.: Methodology in Basic Genetics, San Francisco S. 209 1963
Rothstein, A.:	Rad. Res. Suppl. 1, 357 (1959)
Sarachek, A.:	Cytologia 19, 77 (1954)

Sarachek, A. u. Lucke, W.H.:	Arch. Bioch. Biophys. 44, 272 (1953)
de Serres, F.J. u. Osterbind, R.S.:	Genetics 47, 793 (1962)
de Serres, F.J.:	XI. Intern Congr. Genet. Den Haag 1963
de Serres, F.J.:	Genetics 50, 21 (1964)
Sherman, F. u. Roman, H.:	Genetics 48, 255 (1963)
Sommermeyer, K.:	In: Strahlenbiologie, Strahlenther. Nuklearmed. 1 (1959)
Sparrow, A.H.:	Rad. Res. 9, 187 (1958)
Spoerl, E., Niedzielski, R.J. Biernat, R.W.:	Rad. Res. 21, 86 (1964)
Stein, W. u. Laskowski, W.:	Zeitschr. Naturf. 13b, 651 (1958)
Stein,W. u. Laskowski, W.:	Zeitschr. Naturf. 15b, 734 (1960)
Swaminathan, M.S. u. Natarajan, A.T.:	Nature 179, 479 (1957)
Swann, M.M.:	Nature 193, 1222 (1962)
Swanson, C.P. u. Stadler, D.L:	In: Hollaender, A.: Rad. Biol. II. 249 (1955)
Till, J.E.:	Rad. Res. 15, 400 (1961)
Towe, A.M. u. Stadler, D.R.:	Genetics 49, 577 (1964)
Warshaw, S.D.:	Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 268 (1952)
Wasch, K. u. Farkasch, J.:	Mikrobiol. (Mosk.) 30, 436 (1961)
Whitehouse, H.L.K.:	Nature 199, 1034 (1963)
Wilkie, D. u. Lewis, D.:	Genetics 48, 1701 (1963)
Witkin, E.M.:	Cold. Spring. Habor Symp. 21, 123 (1956)
Witkin, E.M.:	Proc. X. Intern. Congr. Gen. I, 280 (1958)
Wolff, S.:	Amer. Natur. 44, 85 (1960)
Wood, T.H.:	Arch. Bioch. Biophys. 52, 157 (1954)
Würgler, F.E.:	XI. Intern. Congr. Gen. Den Haag (5.48.) (1963)
Yeast Genetic Conference 1961, Carbondale:	Micr. Genet. Bull. Suppl. zu 19 (1963)
Yuasa, A. u. Lindegren, C.C.:	J. Microb. Serol. (1959)
Zimmer, G.K.:	Abhandl. d. Math.-Nat. Kl. 3 Wiesbaden (1960)

Herrn Prof. Dr. W. Stein bin ich für das Thema dieser Arbeit, sowie zahlreiche Anregungen und Diskussionen zu Dank verpflichtet.
Insbesondere möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Laskowski danken, der die experimentelle Durchführung der Arbeit durch viele Hinweise und Diskussionen sehr gefördert hat.

Fräulein Christa Umlauf, Fräulein Elke Fink und Fräulein Heinke Kirschfeld haben zu verschiedenen Zeiten durch verantwortungsvolle Assistenz bei der Durchführung der Experimente sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen, wofür ich ihnen herzlich danken möchte. Mein besonderer Dank gilt Fräulein Kirschfeld für die von ihr durchgeführten sehr aufwendigen Arbeiten mit dem Mikromanipulator.

Dem Kurator der Freien Universität möchte ich an dieser Stelle danken für die Bereitstellung von Reisekostenzuschüssen für Fahrten zu wissenschaftlichen Kongressen, die den Fortgang der Arbeit gefördert haben.

Lebenslauf

Am 6. Juli 1936 wurde ich als Sohn des Buchhändlers Gerhard Haefner in Berlin geboren. - Meine Einschulung erfolgte im Jahre 1942, im Frühjahr 1955 legte ich das Abitur ab.

Anschließend begann ich mein Studium an der Technischen Universität Berlin und bestand dort das Vordiplom (Fachrichtung Physik) im Sommer 1958. - Um auf dem Gebiet der Biophysik arbeiten zu können, ließ ich mich 1960 an der Freien Universität Berlin einschreiben und wurde im Frühjahr 1962 nach bestandener Diplom-Hauptprüfung (Fachrichtung Physik) wissenschaftlicher Assistent am Institut für Biophysik.

Das Thema für die vorliegende Arbeit erhielt ich im Herbst 1961 von Herrn Prof. Dr. W. Stein.